

Liikkuvan kielen syöpä: sukupuolihormonien ja nikotiinin vaikutus kielisyöpäsolujen käyttäytymiseen in vitro ja $\alpha 7$ -nikotiinireseptorin yhteys kielisyövän patogeneesiin

Tobias Sallinen

Hammaslääketieteen kandidaatti

Hammaslääketieteen laitos

Helsinki 11.8.2016, viimeksi muokattu 5.9.2018

Tutkielma

tobias.sallinen@helsinki.fi

Ohjaajat:

Tuula Salo, HLT, Professori

Ahmed Al-Samadi, HLT

Islam Faress, FM

HELSINGIN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Lääketieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution – Department Hammaslääketieteen laitos	
Tekijä – Författare – Author Tobias Aleksi Sallinen			
Työn nimi – Arbetets titel – Title			
Oppiaine – Läroämne – Subject Suupatologia			
Työn laji – Arbetets art – Level Syventävä tutkielma	Aika – Datum – Month and year 6/2016-9/2018	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 43	
<p>Tiivistelmä – Referat – Abstract</p> <p>Kielisyöpä jaetaan kielen kannan ja liikkuvan kielen alueen (2/3 etuosa) syöpiin. Yleisin syöpä kielessä on levyepiteelikarsinooma. Merkittävimmät liikkuvan kielen syövän riskitekijät ovat tupakan ja alkoholin sisältämät karsinogeenit. Kielisyöpä esiintyy yleisimmin iäkkäillä miehillä ja lähettäessään herkästi etäpesäkkeitä sen ennuste on yleensä melko huono.</p> <p>Tutkielmani kirjallisuuskatsauksessa käsitellään kielisyöpää yleisesti, sekä syvennyttään nikotiinin ja sukupuolihormonien merkitykseen taudin patogeneesissä. Kokeellisen laboratoriotutkimusosuuden tarkoituksena oli selvittää nikotiinin ja sukupuolihormonien, estradiolin ja dihydrotestosteronin (DHT:n), vaikutusta kielisyöpäsolujen jakaantumiseen, migraatioon ja invaasioon altistamalla HSC-3- ja SCC-25-kielisyöpäsolulinjojen soluja näille aineille. Nikotiinin merkitystä tutkittiin lisäksi Oulun ja Tampereen yliopistollisista sairaaloista saaduilla histologisilla liikkuvan kielen syöpien potilasnäytteillä, jotka värjättiin spesifisellä $\alpha 7$-nikotiinireseptorivasta-aineella.</p> <p>Laboratoriotulosten perusteella estradioli vähensi molempien kielisyöpäsolulinjojen invaasiota ja migraatiota, mutta jakautumisnopeuteen sillä ei ollut vaikutusta. Nikotiinilla ja DHT:lla ei ollut vaikutusta kielisyöpäsolujen invaasioon, migraatioon tai jakautumiseen. Immunohistokemiallisen värjäyksen perusteella $\alpha 7$-nikotiinireseptorin voimakas ilmeneminen kielisyövässä on yhteydessä kielisyövän uusiutumiseen. Tulosten mukaan estradioli saattaa olla yksi kielisyövän esiintyvyyden eroja selittävistä tekijöistä miesten ja naisten välillä sekä naisilla eri ikäryhmien välillä. Lisäksi uskomme erityisesti kielisyövän tukikudoksen $\alpha 7$-nikotiinireseptorien omaavan merkitystä taudin patogeneesille.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Kielisyöpä, Nikotiini, Estradioli, Dihydrotestosteroni, DHT, Nikotiinireseptori			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

Sisällysluettelo

1. Johdanto	1
2. Kirjallisuuskatsaus	2
2.1 Kielisyövän epidemiologia	2
2.2 Kielisyövän etiologia	3
2.3 Nikotiini, estradioli ja DHT elimistössä	4
2.3.1 Nikotiinin imeytyminen ja metabolia	4
2.3.2 Nikotiinireseptorit	5
2.3.3 Estradioli	6
2.3.4 Dihydrotestosteroni (DHT)	6
2.4 Kielisyövän patogeneesi	7
2.4.1 Tupakka	8
2.4.2 Nikotiini ja nikotiinireseptorit	9
2.4.3 Estradioli ja estrogenireseptorit	10
2.4.4 DHT ja androgeenireseptorit	10
2.5 Kielisyövän ennuste	11
2.6 Kielisyövän hoito	12
3. Tutkimuksen tarkoitus	13
4. Aineisto ja menetelmät	14
4.1 Aineisto	14
4.1.1 Solulinjat	14
4.1.2 Immunohistologiset kielisyövän kudosleikkeet	14
4.2 Menetelmät	16
4.2.1 Nikotiinin, estradiolin ja DHT:n laimennokset	16
4.2.2 Solujen jakautuminen: Bromodeoksiuridiini (BrdU) -leimausmenetelmä	16
4.2.3 Solujen invaasio: Myogeeillä päällystetyt Transwell-kuoppalevyt	17
4.2.4 Migraatio ja invaasiokokeet: IncuCyte <i>Scratch wound healing</i> -menetelmä	18
4.2.5 Immunohistologisten kielisyöpäkudoksenäytteiden valmistelu	20
4.2.6 Immunovärjättyjen lasien mikroskopiointi	20
4.2.7 Tilastolliset analyysit	21
5. Tulokset	22
5.1 Tutkittavat aineet eivät vaikuttaneet HSC-3-solujen jakaantumiseen tai invaasioon	22
5.2 Estradioli hidasti HSC-3- ja SCC-25-solujen migraatiota ja invaasiota <i>scratch wound healing</i> -kokeissa	22
5.3 $\alpha 7$ -nikotiinireseptorin voimakas ilmeneminen kudosleikkeen strooman tulehdussoluissa korreloi kielisyövän uusiutumiseen	25
6. Pohdinta	27
Kirjallisuus	30
Liitteet	34

1 Johdanto

Pään ja kaulan alueen syövät ovat kuudenneksi yleisimpiä syöpiä maailmanlaajuisesti ja noin 90 %:ssa tapauksista kyseessä on levyepiteelikarsinooma. Suuontelon syövistä noin 40-50% on kielen syöpiä. (1) Muita harvinaisempia pään ja kaulan alueen syöpätyyppejä ovat sarkoomat ja lymfoomat. Anatomisen sijainnin perusteella pään ja kaulan alueen levyepiteelisyövät jaetaan suun, nenänielun, suunielun, alanielun, nenäontelon ja kurkunpään syöpiin. (2) Tässä tutkielmassa käsiteltävällä kielisyövällä tarkoitetaan kielen liikkuvan osan levyepiteelikarsinoomaa. Kieli koostuu suuontelossa sijaitsevasta liikkuvasta osasta (kielen etu- ja keskikolmannes) sekä suunieluun kuuluvasta tyvestä (kielen taaimmaisoin kolmannes). Kielisyöpä kuuluu suuontelon syöpiin, kun taas kielen tyven syövät lasketaan osaksi suunielun syöpiä. (3)

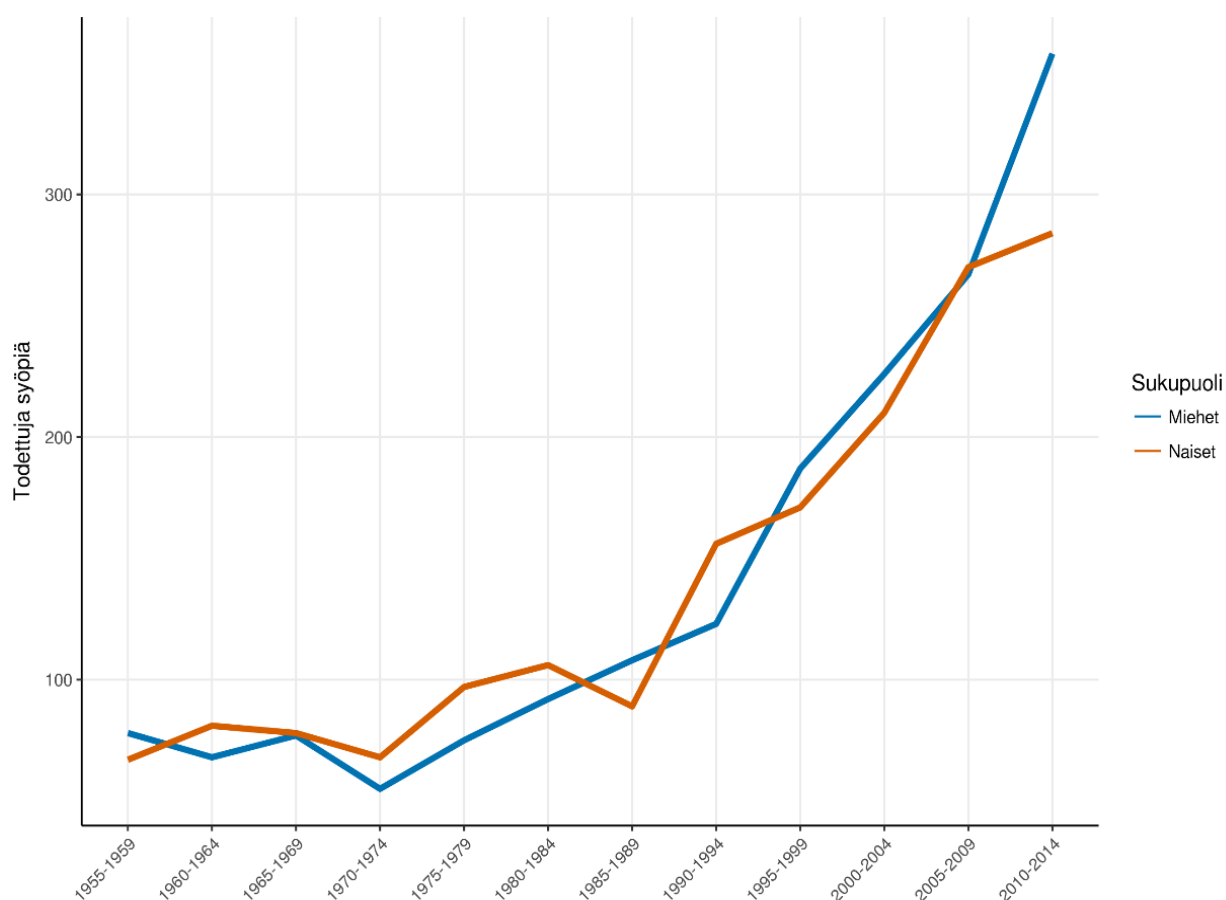
Kielisyövän, kuten muidenkin suusyöpien, esiintyvyys on miehillä suurempi kuin naisilla (1,5:1), mikä on luonut hypoteesin sukupuolihormonien vaikutuksesta sairastumisriskiin. Lisäksi esiintyvyys on suurempaa iäkkäämmillä, yli 50-vuotiailla. Merkittävimmät tiedossa olevat riskitekijät ovat tupakointi sekä alkoholin suurkulutus, ja erityisen haitallista on kyseisten tekijöiden yhtäaikainen käyttö niiden synergistisen vaikutuksen vuoksi. Alkuvaiheen oireilu on usein vähäistä eikä potilaalla välttämättä ole kipuja. Tämä edellyttää lääkäreiltä ja hammaslääkäreiltä taitoa tunnistaa alkuvaiheen muutoksia. Kielisyöpää mahdollisesti edeltäviä, ja täten tarkkailtavia tai hoidettavia, limakalvomuutoksia ovat leukoplakia, erytroplakia sekä punajakälä. Kielisyöpään liittyviä oireita ovat esimerkiksi kielen kipu, kyhmy, haavauma tai myöhemmässä taudin vaiheessa nielemisvaikeudet, puheen häiriöt sekä patti kaulalla ja painon putoaminen. Taudinkuvaa vaikeuttaa lisäksi kielisyövän taipumus lähettää etäpesäkkeitä pään ja kaulan alueen imusolmukkeisiin. (2, 4) Kielisyöpä esiintyy tyypillisesti kielen reuna- tai alapinnalla (3). Muutoksen toteaminen syöväksi perustuu aina kudoksen ottoon sekä siinä nähtäviin muutoksiin. Potilaan yleiskunnon ja kasvaimen levinneisyyden mukaan hoidoksi sovelletaan leikkauksen, sädehoidon ja sytostaattien yhdistelmää. (2)

2 Kirjallisuuskatsaus

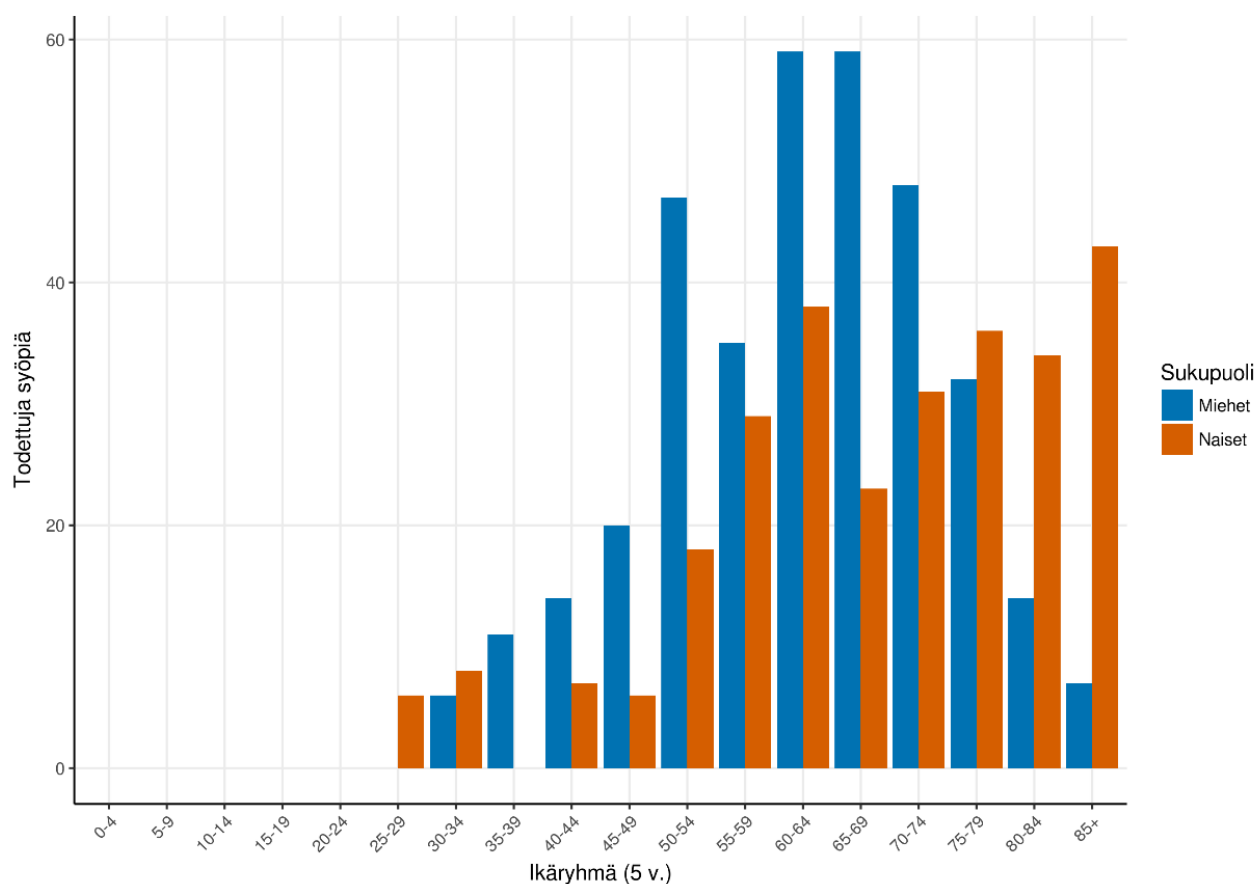
2.1 Kielisyövän epidemiologia

Kielisyövän ilmaantuvuus Suomessa on ollut kasvussa 1980-luvulta lähtien sekä miehillä että naisilla (kuvaaja 1). Suomen Syöpärekisterin uusimpien tilastojen mukaan kielisyöpään sairastui vuosina 2010 - 2014 enemmän miehiä kuin naisia. Uusien tapausten lukumäärät vastaavassa järjestyksessä olivat 358 ja 284 (5), joten sukupuolten välinen sairastumissuhde on Suomessa noin 1,25:1. Tämä on muualla maailmalla vallitsevaa noin 1,5:1 sairastuvuussuhdetta pienempi (1, 4). Keski-ikä sairastuneille on noin 61-64 vuotta (4, 6, 7), mikä tekee kielisyövästä pääasiassa vanhemman väestön sairauden (kuvaaja 2).

© Suomen Syöpärekisteri 08.06.2017



Kuvaaja 1. Suomessa vuosina 1955-2014 todetut kielisyöpätapaukset sukupuolittain. (5)



Kuvaaja 2. Suomessa vuosina 2010-2014 todetut kielisyöpätapaukset ikäryhmittäin. (5)

2.2 Kielisyövän etiologia

Kielisyövän merkittävimmät yksittäiset riskitekijät ovat tupakointi ja alkoholinkäyttö. Yhteys syövän kehittymiseen on annos- ja aikariippuvaista siten, että riski kasvaa päivittäin kulutettujen annosten ja käyttövuosien mukaan. Riski sairastumiseen kasvaa noin 2-3 kertaiseksi vähintään 20 savuketta päivässä 20 vuoden ajan polttaneilla tai vähintään 15 annosta alkoholia viikossa nauttivilla. Pitkä- ja yhtäaikainen tupakka- ja alkoholituotteiden suurkulutus kasvattaa sairastumisriskin monikymmenkertaiseksi. Tupakoimisen lopettaminen puolestaan pienentää sairastumisriskiä sitä mukaan, mitä pidempi aika lopettamisesta on kulunut. (8) Poltettavien tupakkatuotteiden lisäksi palamattomien tuotteiden, kuten purutupakan ja nuuskan, käyttö voi kasvattaa sairastumisriskiä hieman. (9)

Suun alueen syöville löytyy tupakkatuotteiden ja alkoholijuomien lisäksi muitakin riskitekijöitä. Yli 25% alkoholia sisältävät suuvedet voivat pitkään käytettyinä kohottaa sairastumisriskiä (10). Ravinnon merkitystä selvittäneet tutkimukset ovat todenneet lihapitoisen ruokavalion kohottavan sairastumisriskiä, kun taas runsaalla hedelmien, kasvien ja kalan syönnillä on todettu olevan suojaava vaikutus (11). Humaani papilloomavirus (HPV:n) on todettu liittyvän kielen tyven syöpiin, mutta sitä ei yleensä esiinny liikkuvan kielen syövässä (12). Huono suuhygienia sekä hammastarkastusten epäsäännöllisyys ovat niin ikään sairastumisen riskitekijöitä (13). Suusyöpien ei ole todettu periytyvän. (14)

2.3 Nikotiini, estradioli ja DHT elimistössä

2.3.1 Nikotiinin imeytyminen ja metabolia

Nikotiini on tupakkakasvista saatava pyridiini-alkaloidi sekä tupakkatuotteiden riippuvuutta aiheuttava komponentti (15). Se täyttää kaikki riippuvuutta aiheuttavan aineen kriteerit, joita ovat pakonomainen käytön tarve, psykoaktiiviset vaikutukset sekä vieroitusoireet käytön estyessä (16). Poltettavista tupakkatuotteista nikotiini imeytyy verenkiertoon sisäänhengitetystä savusta keuhkoissa sekä pienemmissä määrin suun limakalvoilta. Imeytynyt nikotiini jakautuu nopeasti verenkiertoon ja läpäisee veriaivoesteen saavuttaen aivot 10-20 sekuntia sisäänhengityksen jälkeen. Yksi savuke sisältää keskimäärin 10-14 mg nikotiinia, josta noin 1-1,5 mg imeytyy elimistöön. Palamattomien tupakkatuotteiden nikotiini imeytyy suun limakalvoilta sekä syljen mukana nieltynä ohutsuolesta. (15)

Nikotiinin pitoisuus verenkierron nousee tupakoitaessa nopeasti ja on suurimmillaan (noin 15 ng/ml laskimoveressä) heti tupakoinnin jälkeen. Palamattomia tupakkatuotteita käytettäessä saavutetaan sama huippupitoisuus hitaammin, minkä lisäksi pitoisuus pysyy kauemmin vakaana tasaisemmasta imeytymistavasta johtuen. Nikotiinin puoliintumisaika verenkierron on noin kaksi tuntia ja sen metabolia tapahtuu maksassa CYP2A6-entsyymillä sekä vähemmissä määrin CYP2B6-entsyymillä. Tärkein, nikotiinin tavoin aktiivinen, metaboliitti (noin 70-80% nikotiinista) on

kotiniini. (15) Vieroitusoireet (esimerkiksi ärtyneisyys, levottomuus, keskittymisvaikeudet, ahdistuneisuus, alakuloisuus, nukahtamisvaikeudet ja kasvanut ruokahalu) alkavat 12 tunnin kuluessa edellisestä nikotiinialtistuksesta ja kestävät kokonaisuudessaan noin kolme viikkoa. (16)

2.3.2 Nikotiinireseptorit

Asetyylikoliinireseptorit jaetaan kahteen alatyyppiin, ionotrooppisiin (ligandista aktivoituvia ionikanavia) nikotiinireseptoreihin sekä metabotrooppisiin (G-proteiinikytkentä) muskariinireseptoreihin, joiden luonnollisena ligandina toimii asetyylikoliini. Nikotiinireseptorit ovat solukalvon transmembraaniproteiineja, jotka koostuvat viidestä symmetrisesti kohtisuoraan kalvoa vasten järjestäytyneestä alayksiköstä ($\alpha 1$ - $\alpha 10$; $\beta 2$ - $\beta 4$; δ ; γ ; ϵ). Alayksiköt ovat rakenteeltaan homologisia, ja erilaisilla yhdistelmillä sekä homo- että heteropentameerit ovat mahdollisia. Nikotiini toimii nikotiinireseptorien agonistina, minkä lisäksi krooninen altistus nikotiinille johtaa nikotiinireseptorien lukumäärään lisääntymiseen. (17)

Nikotiinireseptoreja löytyy niin hermostosta kuin myös hermoston ulkopuolisista kudoksista, ja niiden aktivaation merkitys vaihtelee kudoksen mukaan. Ligandin sitoutuminen nikotiinireseptoriin avaa sen ionikanavana toimivan osan, jolloin Na^+ - ja Ca^{2+} -ioneja virtaa solun sisälle ja K^+ -ioneja solusta ulos. Hermostossa seurauksena on hermovälittäjäaineiden, kuten asetyylikoliinin, noradrenaliinin, dopamiinin, serotoniinin, beeta-endorfiinin tai glutamaatin vapautuminen. Nikotiinin aikaansaamat mielihyvän tuntemukset ovat peräisin aivoissa accumbens-tumakkeesta vapautuvasta dopamiinista, joka aktivoi mesolimbisen dopaminergisen hermoradan. Tilanteesta riippuen seurauksena voi olla mukava, piristynyt tai rentoutunut olo, lieventynyt ahdistus tai kognitiivisten toimintojen paraneminen. Hermoston ulkopuolisten nikotiinireseptorien uskotaan puolestaan olevan yhteydessä moniin solun biologisiin toimintoihin solun sisälle virtaavien Ca^{2+} -ionien välityksellä. Kytköksiä on löydetty esimerkiksi solun jakautumisen, erilaistumisen, puolustuksen, kuoleman, tukirangan järjestäytymisen ja solu-solu kontaktien säätelyyn. (17)

2.3.3 Estradioli

Estradioli (17 β -estradioli, E2) on estronin (E1) ja estriolin (E3) ohella estrogeeneihin kuuluva steroidirakenteinen naissukupuolihormoni, jonka pääasialliset tehtävät liittyvät naisten kuukautiskierron sekä sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien kehitykseen ja säätelyyn. Lisäksi estradioli vaikuttaa esimerkiksi mielialaan, luuston tiheyteen, ihon kimmoisuuteen sekä hormoniriippuvaisten syöpien kehitykseen. Estradiolia muodostuu pääasiallisesti naisten munasarjoissa kehittyvissä munarakkuloissa, ja sen erityis on vahvasti kytköksissä kuukautiskierron eri vaiheisiin. Synteesistä vastaa aromataasi-entsyymi, joka aromatisoi androgeenejä (testosteroni ja androstenedioni) estrogeeneiksi. Täten muutkin aromataasia ilmentävät kudokset (esimerkiksi lihas- ja rasvakudos) kykenevät tuottamaan estradiolia pienemmissä määrin. Estradiolin, kuten muidenkin estrogeenien, synteesiä esiintyy myös miehillä (esimerkiksi Leydigin soluissa), joilla kyseiset hormonit vaikuttavat muun muassa siittiöiden ja luuston kehitykseen. (18, 19)

Estradiolin biologiset vaikutukset välittyvät solulimassa sijaitsevien estrogeenireseptorien (ER) kautta, joita on kahta alatyyppeä: ER α ja ER β . Reseptori-estradioli-kompleksi toimii aktivoituttuaan transkriptiotekijänä, joka kulkeutuu tumaan, dimerisoituu ja sitoutuu DNA:han vaikuttaen geenien ilmenemiseen. Lisäksi osa soluista (esimerkiksi osteoblastit, neuronit, endoteeli- ja rintasyöpäsolut) omaa solukalvolla sijaitsevia estrogeenireseptoreja, jotka aktivoivat solunsisäisiä geenien ilmenemiseen vaikuttavia viestiketjuja. Estradiolin affiniteetti estrogeenireseptoreihin on muita estrogeenejä voimakkaampaa. (19)

2.3.4 Dihydrotestosteroni (DHT)

Testosteroni on androgeeneihin kuuluva steroidirakenteinen miessukupuolihormoni, jonka pääasialliset tehtävät liittyvät miesten primaaristen ja sekundaaristen sukupuoliominaisuuksien kehitykseen ja säätelyyn. Lisäksi testosteroni vaikuttaa esimerkiksi luuston tiheyteen, lihasmassan määrään sekä mielialaan. Testosteroni syntetisoidaan kolesterolista miehillä kivesten Leydigin soluissa sekä pienemmissä määriin esimerkiksi iholla, rasva- ja lihaskudoksessa sekä lisämunuaisissa.

Androgeenien synteesiä esiintyy myös naisilla, joilla niitä tarvitaan muun muassa estrogeenien tuotantoon. (18) Mikäli kohdesolu ilmentää 5 α -reduktaasia, pelkistää se osan soluun kulkeutuneesta testosteronista dihydrotestosteroniksi (5 α -dihydrotestosteroni, DHT). DHT on testosteronia potentimpi androgeeni, ja vastuussa lähes yksinomaan androgeenien biologisista vaikutuksista. (20)

Androgeenien biologiset vaikutukset välittyvät kohdesolun solulimassa olevan androgeenireseptorin (AR) kautta. Reseptori-androgeeni-kompleksi toimii aktivoiduttuaan transkriptiotekijänä, joka kulkeutuu tumaan, dimerisoituu ja sitoutuu DNA:han vaikuttaen geenien ilmenemiseen. Androgeenireseptorien ei itsessään ajatella ilmenevän solukalvolla, mutta androgeenit saattavat aktivoida solunsisäisiä viestiketjuja muiden solukalvon proteiinien, kuten SHBG-reseptorikompleksin (sukupuolihormoneja sitova globuliini), kautta. (21)

2.4 Kielisyövän patogeneesi

Vallitsevan syövän syntyteorian, eli somaattinen mutaatio -teorian, mukaan syöpä pohjautuu DNA:n mutaatioihin, jotka antavat solulle kasvuedun ja kertyvät solukkaan. Syövän patogeneesi jaetaan teorian mukaan initiaatioon, promootioon ja progressioon. Initiaatiossa solu altistuu DNA:n muutoksille, jotka voivat olla ulkoisten tekijöiden aiheuttamia tai spontaaneja. Ulkoiset tekijät jaetaan kemiallisiin ja fysikaalisiin karsinogeeneihin sekä mikrobeihin. Mutaatioiden alkuperästä riippumatta oleellista on niiden kohdistuminen ja kertyminen proto-onkogeeneihin sekä kasvunrajoitegeeneihin. Virheet proto-onkogeeneissa voivat johtaa kasvunsäätelyn häiriintymiseen ja solunjakautumisen kiihtymiseen, minkä lisäksi solu voi menettää kyvyn solusyklin pysäyttämiseen kasvunrajoitegeenien virheiden seurauksena. Mikäli mutaatiot antavat solulle kasvuedun, seuraa promootiovaihe, jossa solu jakaantuu kasvattaen jatkuvasti mutatoituneen solukon kokoa. Syntynyt kasvainsolukko on yleensä aluksi homogeeninen, mutta progressiovaiheen aikana syntyvät uudet ominaisuudet muokkaavat sitä heterogeeniseksi. Uudet mutaatiot kohdistavat soluihin valintapaineen, jolloin kulloinkin parhaan kasvu- ja vastustuskyvyn tarjoamat mutaatiot yleistyvät. (2)

Syöpäsoluille omaiset piirteet tunnetaan nykyään pitkälti Douglas Hanahanin ja Robert A. Weinbergin kirjoittamien katsausartikkelien ”Hallmarks of Cancer” sekä ”Hallmarks of Cancer: The Next Generation” pohjalta. Heidän mukaansa syöpäsolun tunnusmerkkejä ovat itsenäinen kasvunsäätely, kyky välttää solukuolema, rajoittamaton jakautumiskyky, piittaamattomuus kasvua jarruttavista tekijöistä, kyky invasiiviseen kasvuun ja etäpesäkkeiden muodostukseen, kyky tuottaa ylimäärin uusia mutaatioita, kyky uudisverisuonten muodostukseen sekä kyky välttää elimistön immuunipuolustus. (22)

2.4.1 Tupakka

Tupakansavu sisältää yli 60 karsinogeeniä, kuten polysyklisiä aromaattisia hiilivetyjä eli PAH-yhdisteitä (esimerkiksi bentsopyreeni), nitrosoamiineja (nikotiinin johdannaisia), aldehydejä sekä vapaita happiradikaaleja. Palamattomat tupakkatuotteet sisältävät samoja karsinogeenejä, mutta vähemmän (16 ainetta), sillä suurin osa niistä muodostuu palamisreaktion yhteydessä. Suurin osa karsinogeeneista käy läpi metabolisen aktivaation sytokromi P450 -entsyymien toimesta, jonka jälkeen niiden sitoutuminen DNA:han (DNA-adduktit) on mahdollista. Mutaatioiden kohdistuminen proto-onkogeeneihin (esimerkiksi RAS- ja MYC-geenit) sekä kasvunrajoitegeeneihin (esimerkiksi p53- ja p16-geenit) voi johtaa syövän initiaatioon. (23)

Tupakoinnin mutageenisia vaikutuksia potensoi yhtäaikainen alkoholin käyttö. Alkoholijuomien sisältämä etanoli ei itsessään ole karsinogeeni, mutta sen ensimmäinen metaboliitti asetaldehydi on suoraan karsinogeeninen soluille. Osa etanolista metaboloituu jo suussa asetaldehydiksi suun mikrobien ja epiteelisolujen alkoholidehydrogenaasin (ADH) toimesta, minkä lisäksi tupakansavusta liukenee asetaldehydiä sylkeen. Korkeaksi nousevan suun asetaldehydipitoisuuden ohella alkoholijuomien etanoli liuottaa suun epiteelisolujen lipidejä lisäten epiteelin läpäisevyyttä kaikille tupakansavun karsinogeeneille. (24)

2.4.2 Nikotiini ja nikotiinireseptorit

Nikotiini on tupakkatuotteiden riippuvuutta aiheuttava komponentti, mutta ei itsessään karsinogeeni. Se kykenee kuitenkin aktivoimaan elimistön nikotiinireseptoreja, jotka ovat yhteydessä syövän patogeneesiin. Lisäksi tupakkaspesifiset nitrosoamiinit, kuten NNK (4-(metyylnitrosoamino)-1-(3-pyridyyli)-1-butanoni) ja NNN (N'-nitrosonornikotiini), kykenevät aktivoimaan nikotiinireseptoreja nikotiinia suuremmalla affiniteetilla. (25)

Ligandin sitoutuminen nikotiinireseptoriin avaa sen ionikanavan, jolloin ionien liike aikaansaa solukalvon depolarisaation. Depolarisaatiota seuraa jänniteherkkien Ca^{2+} -kanavien avautuminen ja solunsisäisen Ca^{2+} -pitoisuuden voimakas kasvu. Ca^{2+} -ionit aktivoivat itsessään sekä vapauttamiensa mitogeenisten aineiden kautta solunsisäisiä viestiketjuja. Aktivoituvia viestiketjuja ovat muun muassa RaS-RaF-MEK-ERK, JAK/STAT sekä PI3K/AKT/mTOR, ja ne vaikuttavat suoraan kohdeproteiineihin tai transkriptiotekijöiden, kuten NF- κ B, E2F, STAT ja AP-1, välityksellä geenien ilmenemiseen. Monet kohteena olevat geenit sekä proteiinit, kuten p53, Bax, Bad, Rb, sykliini D1, Bcl-2, ovat keskeisiä solun elämänsäkierron säätelyssä. Nikotiinireseptorien aktivaation on todettu parantavan syöpäsolujen kykyä välttää kuolema sekä kiihdyttävän niiden kasvua, jakaantumista, migraatiota, invaasiota ja uudisverisuonten muodostusta. (25)

Mahdollisesti tärkeimmäksi nikotiinireseptoriksi syöpäsoluille tutkimukset mainitsevat $\alpha 7$ -nikotiinireseptorin, sillä se omaa poikkeuksellisen korkean läpäisevyyden Ca^{2+} -ioneille (17). Kyseinen reseptori ilmenee myös suun epiteelin soluissa, joissa sen aktivaatio voi edistää solujen elämänsäkiertoa ja jakautumista muun muassa RaS-RaF-MEK-ERK- sekä JAK/STAT-viestiketjujen aktivaatiolla. Alfa-7-nikotiinireseptorin salpaus antagonistilla, kuten alfabungarotoksiinilla, voi vaimentaa nikotiinin biologiset vaikutukset kokonaan, mikä tekee siitä potentiaalisen kohteen uusille syöpälääkkeille. (26) Nikotiinireseptorien aktivaation on todettu edistävän pään ja kaulan alueen syöpien syntyä ja kehitystä esimerkiksi kasvattamalla transkriptiotekijöiden, kuten GATA-3, NF- κ B ja STAT-1, aktiivisuutta (27), minkä lisäksi nikotiini parantaa suun syöpäsolujen selviytymistä kasvattamalla surviviinin määrää sekä estämällä syöpälääke sisplatiinin toimintaa. (28)

2.4.3 Estradioli ja estrogenireseptorit

Estradiolin biologiset vaikutukset välittyvät joko suoraan solunsisäisten estrogenireseptorien kautta tai solukalvolta toisiolähettiläin, kuten Ca^{2+} -ionin ja typpimonoksidin, aktivoimien viestiketjujen välityksellä. Estrogenireseptorien aktivaatiolla on todettu olevan edistävä vaikutus hormonisäätelyn alaisten kudosten, kuten rintojen, kohdun ja munasarjojen, syöpien kehitykseen. Esimerkiksi ER-positiivisen (estrogenireseptoreita yli-ilmentävän) rintasyövän yhteydessä estrogenireseptorien aktivaatio kiihdyttää solujen jakautumista sekä DNA:n kahdentumista lisäten mutaatioiden määrää. (29) Syöpää edistävien vaikutusten ohella estradiolilla on kuitenkin myös päinvastaisia ominaisuuksia. Matalaestrogenisen hormonihoidon seurauksena rintasyöpäsolujen on havaittu herkistyvän estradiolille, jolla on tämän jälkeen saatu aikaan solukuolema. (30) Rintasyöpäsolujen estrogenireseptorialatyypeilla on myös merkitystä, sillä ER β -reseptorin ilmenemisellä on todettu syövältä suojaavia vaikutuksia. (31)

Monet hormoneista riippumattomiksi mielletyt syövät ovat yleisempiä miehillä kuin naisilla, mikä on luonut hypoteesin estrogenien syövältä suojaavasta vaikutuksesta. Esimerkiksi mahasyövän osalta on saatu hypoteesia tukevia tuloksia, sillä estrogenihormonihoitojen on havaittu alentavan sairastumisriskiä (32, 33). Myös suun alueen syövissä esiintyy estrogenireseptoreita (34), mutta sukupuolieroja ne eivät selitä. ER α -reseptorin voimakkaan ilmenemisen on todettu korreloivan huonontuneeseen ennusteeseen (35) sekä kiihdyttävän syöpäsolujen kasvua muun muassa lisäämällä FAK-proteiinin ilmenemistä (36). ER β -reseptorin ilmenemisen on puolestaan havaittu vaikuttavan positiivisesti ennusteeseen ainakin suunielun syöpien kohdalla. (37)

2.4.4 DHT ja androgeenireseptorit

DHT:n biologiset vaikutukset välittyvät solunsisäisten transkriptiotekijöinä toimivien androgeenireseptorien kautta, joiden aktivaatiolla on erityisesti eturauhassyövässä merkitystä. Testosteroni on välttämätöntä eturauhasen normaalin kasvun kannalta,

mutta liikakasvun yhteydessä se lisää eturauhasen solujen kasvua entisestään sekä parantaa niiden selviytymistä. Esimerkiksi solusykliä kiihdyttävien sykliiniriippuvaisten kinaasien (CDK 2 ja 4) määrät kasvavat, kun taas solusykliä hidastavan p16-proteiinin ja solukuolemaa edistävän bcl-2-proteiinin määrät vähenevät. (38)

Sukupuolierot useiden syöpien esiintyvyydessä ovat luoneet hypoteesin androgeenien syövälle altistavista ominaisuuksista, ja esimerkiksi mahasyövän kohdalla androgeenireseptorien aktivaatiolla saattaa olla osuutta syövän kehitykseen ja sukupuolieroihin (39). Samansuuntaisia tuloksia on saatu myös suun alueen syöivistä, sillä androgeenireseptoreja esiintyy suuremmissa määrin miesten kuin naisten kasvaimissa (34) sekä useammin pahanlaatuisissa kuin hyvänlaatuisissa kasvaimissa. Reseptorien ilmenemisen on todettu olevan yhteydessä suusyöpäsolujen kasvuun ja selviytymiseen muun muassa kasvattamalla solusykliä kiihdyttävän sykliini D1:n määrää ja vähentämällä solukuolemaa edistävän bcl-2-proteiinin määrää. (40)

2.5 Kielisyövän ennuste

Kielisyövän ennuste riippuu oleellisesti sen koosta ja levinneisyydestä (nk. TNM-luokitus T1-T4) toteamishetkellä (taulukko 1). Suomessa viiden vuoden eloonjäämisennuste varhaisvaiheen (T1) kasvaimen kohdalla on 79-87%, kun myöhäisvaiheessa (T4) se on enää 27-38%. (6, 7) Suomessa vuosina 2005-2009 diagnosoitujen kielisyöpäpotilaiden keskimääräinen viiden vuoden eloonjäämisennuste oli 76% (7). Kieli omaa tiheän imusuoniston ja on rakenteeltaan suurimmaksi osaksi lihasta, mikä tekee siitä poikkeuksellisen herkän syövän invaasiolle ja metastasoinnille. Invaasiota tapahtuu erityisesti lihaksiin, suun pohjaan ja alaleuan ikeniin, kun taas etäpesäkkeitä muodostuu erityisesti kaulan imusolmukkeisiin. (3) Paikallisen kasvaimen, joka on alle 4 cm, ja jossa ei ole kliinisesti todettuja kaulan imusolmukemetastaaseja (T1/T2N0M0), ominaisuuksista ennusteeseen vaikuttavaa eniten sen syvyyskasvu. Kielen pinnalta 4 mm tai syvemmälle ulottuva kasvain korreloi huonontuneeseen ennusteeseen verrattuna pinnallisempiin kasvaimiin. (41) Hoitoa seuraava ennusteen paraneminen on suoraan yhteydessä hoidettavan kasvaimen TNM-luokkaan siten, että suotuisin tulos on odotettavissa T1N0M0-, T1N1M0- ja T2N0M0-

luokan kasvainten kohdalla. Mahdollinen syövän uusiminen tapahtuu yleensä 60 kuukauden kuluessa hoidosta, joten hoidon jälkeinen tiheä seuranta voi paljastaa jatkohoidon tarpeen ja vaikuttaa näin positiivisesti potilaan ennusteeseen. (42)

Varhaisvaiheen kielisyövällä on muihin suun alueen syöpien varhaisvaiheen kasvaimiin nähden huonompi ennuste. (43)

T = Primaarikasvain	N = Paikalliset imusolmukkeet
T1: Halkaisija ≤ 2 cm, invaasiosyvyys ≤ 5 mm	N0: Ei paikallisia imusolmuke-etäpesäkkeitä
T2: Halkaisija ≤ 2 cm, invaasiosyvyys > 5 mm ja ≤ 10 mm tai halkaisija 2-4 cm ja invaasiosyvyys ≤ 10 mm	N1: Enintään 3 cm etäpesäke yksittäisessä samanpuoleisessa imusolmukkeessa
T3: Halkaisija > 4 cm tai invaasiosyvyys > 10 mm	N2: 3-6 cm etäpesäke imusolmukkeessa
T4: Kasvain jatkuu muihin kudoksiin	N3: Yli 6 cm etäpesäke imusolmukkeessa
M = Kaukana sijaitsevat etäpesäkkeet	Kasvainten levinneisyysaste
M0: Ei kaukana sijaitsevia etäpesäkkeitä	Luokka 1: T1N0M0
M1: Kaukana sijaitsevia etäpesäkkeitä	Luokka 2: T2N0M0
	Luokka 3: T3N0M0 tai T(1-3)N1M0
	Luokka 4: T4N0M0 tai T(1-4)N2M0 tai T(1-4)N3M0 tai T(1-4)N(1-3)M1

Taulukko 1. Pään ja kaulan alueen syöpien TNM-luokittelu. (44, 45)

2.6 Kielisyövän hoito

Kielisyövän tärkeimmät hoitomuodot ovat kirurginen hoito sekä sädehoito joko yksinään tai toisiinsa yhdistettynä. Lisäksi solunsalpaajia voidaan käyttää potilaasta riippuen tehostamaan hoitoa, mutta yksinään ne eivät toimi parantavana hoitona. Hoitomuodon valintaan vaikuttaa kasvaimen TNM-luokitus sekä potilaan yleiskunto. Pienet paikalliset kasvaimet (T1/T2N0M0) hoidetaan yleensä paikallisella leikkauksella. Mikäli leikkaus ei potilaasta johtuvista syistä sovi hoitomuodoksi, käytetään sädehoitoa. Kliinisesti paikallisten kasvainten kohdalla tulee harkita kudoksen ottoa vartijaimusolmukkeesta metastaasien poissulkemiseksi.

Laajempien sekä kaulaan etäpesäkkeitä lähettäneiden kasvainten yhteydessä tehdään paikallisen poiston lisäksi kaulan imusolmukkeiden poisto yleensä sädehoitoon yhdistettynä. (2, 46) Kirurgista poistoa saattaa seurata korjaavan hoidon tarve, sillä sekä kielen osittain (hemiglossektomia) että kokonaan (glossektomia) poistaminen aiheuttaa merkittävän haitan puheen tuotolle, nielemiselle sekä pureskelulle. Pienissä poistoissa (enintään kolmasosa kielestä) kudospuutos voidaan jättää avoimeksi, jolloin paraneminen tapahtuu granulaatiokudoksen ja epitelisaation kautta, sulkea suoraan tai korjata paikallisella kielekkeellä. Tätä laajemmat poistot korjataan esimerkiksi kyynärvarresta tai reidestä saatavalla etäkielekkeellä, ja toiminnallinen haitta saattaa jäädä pysyväksi korjatun kielen heikentyneen liikekyvyn vuoksi. (3, 46)

3 Tutkimuksen tarkoitus

Tutkimus jakautui kahteen osaan: laboratoriossa syöpäsoluilla tehtävään kokeelliseen tutkimukseen sekä kielisyöpäpotilaiden kudospäätteiden immunohistologisten leikkeiden analyysiin.

Tutkimuksen laboratorio-osuuden tarkoituksena oli selvittää nikotiinin, estradiolin sekä DHT:n merkitystä kielisyövässä. Nikotiini on tupakkatuotteiden riippuvuutta aiheuttava komponentti sekä potentiaalinen syöpää edistävä tekijä. Aikaisempaa tutkimusta nikotiinin vaikutuksista suun syöville on tehty vähän, joten tarkoituksemme oli kartuttaa lisätietoa. Sukupuolihormonien vaikutuksia tutkittiin, sillä kielisyöpä on miehillä yleisempi sairaus kuin naisilla. Naisilla kielisyövän esiintyvyys on suurempaa vanhemmissa ikäluokissa (kuvaaja 2), mikä voi osittain johtua sukupuolihormonien tuotannon vähenemisestä. Tarkoituksemme oli selvittää, löytyykö estradiolista ja DHT:sta selityksiä näille eroille. Tutkimus suoritettiin altistamalla kahta eri kielisyövän solulinjaa (HSC-3 ja SCC-25) kyseisille aineille useilla eri pitoisuuksilla. Mielenkiinnon kohteena olivat vaikutukset solujen jakaantumiseen, migraatioon ja invaasioon.

Tutkimuksen $\alpha 7$ -nikotiinireseptorivasta-aineella leimattujen kudospäätteiden analyysin tarkoituksena oli selvittää, liittyykö reseptorin esiintymisessä nähtävät erot potilaan

ennusteeseen. Nikotiini toimii ligandina $\alpha 7$ -nikotiinireseptorille, joka on erityisominaisuuksiensa vuoksi potentiaalinen tekijä syövän patogeneesissä.

4 Aineisto ja menetelmät

4.1 Aineisto

4.1.1 Solulinjat

Meillä oli käytössämme kaksi eri liikkuvan kielen syövän solulinjaa: erittäin aggressiivinen HSC-3 (JRCB 0623, Japan Health Science Research Resources Bank, Osaka, Japani) sekä vähemmän aggressiivinen SCC-25 (CRL-1628, ATCC cultures, Teddington, Iso-Britannia). Soluja viljeltiin DMEM/F-12 -elatusaineessa (Dulbecco's modified Eagle's medium/Nutrient Mixture F-12, Life Technologies), jossa oli 10% nautasikiön seerumia (fetal bovine serum, FBS, Life Technologies), 50 $\mu\text{g/ml}$ askorbiinihappoa, 0,4 $\mu\text{g/ml}$ hydrokortisonia, 100 U/ml penisilliiniä, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomysiiniä ja 250 ng/ml fungizone amfoterisiini B:tä (kaikki Sigma-Aldrichiltä). Soluja viljeltiin inkubaattorissa (lämpö 37 °C ja CO₂-pitoisuus 5%) ja niiden rutiininomaisessa jaossa käytettiin trypsiini-EDTA-liuosta (Sigma-Aldrich).

4.1.2 Immunohistologiset kielisyövän kudosleikkeet

Saimme $\alpha 7$ -nikotiinireseptorin vasta-aineella leimattuja immunohistologisia kielisyövän kudosleikkeitä yhteensä 81 kappaletta. Näytteistä 63 oli kerätty Oulun yliopistollisessa sairaalassa (OYS) ja 18 Tampereen yliopistollisessa sairaalassa (TAYS) kielisyöpää sairastaneilta potilailta. Näistä yhteensä 13 hylättiin, 4 OYS:sta ja 9 TAYS:sta, sillä ne edustivat joko kielen tyven syöpää tai olivat biopsioita. Tutkimukseen valikoitui mukaan täten yhteensä 68 liikkuvan kielen levyepiteelikarsinoomaa edustavaa kudosnäytettä, joista 59 oli OYS:sta ja 9 TAYS:sta. Potilaiden sukupuolijakauma oli hyvin tasainen, 35 miestä ja 33 naista, ja keski-ikä noin 65 vuotta. Kaikki kliiniset potilastiedot löytyvät taulukosta 2.

N (%)	Kaikki potilaat (n = 68)	OYS (n = 59)	TAYS (n = 9)
Potilastiedot			
Sukupuoli			
Mies	35 (51)	29 (49)	6 (67)
Nainen	33 (49)	30 (51)	3 (33)
Ikä diagnoosihetkellä			
≤ 50	9 (13)	8 (13)	1 (11)
51-69	30 (44)	27 (46)	3 (33)
≥ 70	29 (43)	24 (41)	5 (56)
Vaihteluväli	27-99	27-99	49-83
Keski-ikä	64.97	64.37	68.89
Tupakointi			
Kyllä	25 (37)	19 (32)	6 (67)
Ei	43 (63)	40 (68)	3 (33)
Seuranta-aika (viikkoina)			
Vaihteluväli	1-251	1-251	2-92
Keskiarvo	52.87	51.66	60.78
Tautivapaa aika (viikkoina)			
Vaihteluväli	1-251	1-251	1-83
Keskiarvo	45.09	44.91	46.22
Kuolinsyy			
Hengissä	29 (43)	24 (41)	5 (56)
Syöpä	18 (26)	17 (29)	1 (11)
Muu	21 (31)	18 (30)	3 (33)
Kasvaimen luokitus			
T1-T2	33 (49)	29 (49)	4 (44)
T3-T4	35 (51)	30 (51)	5 (56)
Taudin uusiutuminen			
Kyllä	29 (43)	25 (42)	4 (44)
Ei	39 (57)	34 (58)	5 (56)

Taulukko 2. Potilastiedot.

4.2 Menetelmät

4.2.1 Nikotiinin, estradiolin ja DHT:n laimennokset

Jokainen koe alkoi nikotiinin (N3876, Sigma-Aldrich), estradiolin (E8875, Sigma-Aldrich) ja DHT:n (D-073, Sigma-Aldrich) laimentamisella, sillä käyttämiemme kaupallisten liuosten pitoisuudet olivat elimistössä esiintyviin pitoisuuksiin nähden hyvin korkeita. Kyseessä oli sarjalaimennos 70% etanoliin, kunnes saavutettiin haluttu pitoisuus. Elimistössä esiintyviä pitoisuuksia kuvaamaan käytettiin 10 μ M nikotiinia, 100 nM estradiolia ja 10 nM DHT:tä. Lisäksi kustakin testattiin viisinkertaista laimennosta ja konsentraattia pitoisuuden merkityksen selvittämiseksi. Koepitoisuudet olivat siten 2 μ M, 10 μ M, 50 μ M nikotiini, 20 nM, 100 nM, 500 nM estradioli ja 2 nM, 10 nM, 50 nM DHT. Pienten pitoisuuksien käsittely luotettavasti on hankalaa, joten aineista valmistettiin aluksi vahvemmat liuokset, ja lopulliset koepitoisuudet laimennettiin näistä vasta käyttöhetkellä tutkittavien solujen joukkoon.

4.2.2 Solujen jakautuminen: Bromodeoksiuridiini (BrdU) -leimausmenetelmä

BrdU on synteettinen nukleosidi ja tymidiinin analogi, joka kykenee sitoutumaan tymidiinin tilalle DNA:ssa sen replikaation (S-vaihe) aikana. DNA:n rakenteeseen jo sitoutunutta tymidiiniä BrdU ei syrjäytä. Koemenetelmä perustui ELISA:an eli entsyymivälitteiseen immunosorbenttimääritykseen. DNA denaturoitiin hapolla ja siihen kiinnittynyt BrdU leimattiin spesifisellä BrdU-vasta-aineella. Indikaattorina käytettiin tetrametyyli-bentsidiiniä, joka hapettuvana väriaineena värjäsi liuoksen keltaiseksi. Liuosten absorbanssi mitattiin spektrofotometrillä, jolloin tulos korreloi suoraan DNA:ssa olevan BrdU:n määrään ja edelleen solujen jakaantumisen määrään.

Käytimme HSC-3-solulinjaa sekä tutkittavista aineista kolmea pitoisuutta: 2 μ M, 10 μ M, 50 μ M nikotiinia, 20 nM, 100 nM, 500 nM estradiolia ja 2 nM, 10 nM, 50 nM DHT:tä. Menetelmän toimivuutta seurattiin kontrolleilla (tutkittava aine korvattu 70% etanolilla). Lisäksi jokaisesta kaivosta tehtiin kolme rinnakkaista kopiota koealustana

toimivalle 96-kuoppalevyille ja koe toistettiin kolme kertaa. Suoritin kokeet FM Islam Faressin kanssa.

Kokeet tehtiin Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) -koepakkauksen (Roche Diagnostics) avulla, jonka käytössä noudatettiin valmistajan laatimia ohjeita. Kokeiden tekohetkellä viimeisin versio ohjeista oli numero 16, josta koemenetelmä löytyy sivuilta 12-13 (47). Jokaiseen kaivoon pipetoitiin 200 µl DMEM/F-12-elatusainetta, joka sisälsi 5000 HSC-3-syöpäsolua sekä nikotiinia, estradiolia tai DHT:tä tutkittavassa pitoisuudessa. Kuoppalevyä inkuboitiin soluviljelyn jälkeen 48 tuntia (lämpö 37 °C ja CO₂-pitoisuus 5%) ja BrdU-leimauksen jälkeen 2 tuntia huoneenlämmössä. Kokeen lopussa tetrametyylibentsidiinin hapetusreaktio pysäytettiin 1 M rikkihapolla ja liuosten absorbanssi mitattiin spektrofotometrillä 450 nm aallonpituudella.

4.2.3 Solujen invaasio: Myogeelillä päällystetyt Transwell-kuoppalevyt

Kokeen alustan muodosti erityinen Transwell-kuoppalevy, jossa kaivojen sisällä oli puoliläpäisevän pohjakalvon omaava kuppi. Syöpäsolut ja tutkittavaa molekyyliä sisältävä elatusaine laitettiin kuppiin, jota ympäröivä kaivo täytettiin tavallisella elatusaineella. Kupin pohjakalvo läpäisi ainoastaan soluja, joten elatusaineet eivät päässeet sekoittumaan keskenään. Koemenetelmä perustui kemotaksiaan eli solujen liikkeisiin ärsykkeenä toimivan aineen ohjaamina. Tutkittavien aineiden vaikutukset solujen invaasioon mitattiin spektrofotometrillä, jolloin liuosten absorbanssi korreloi suoraan kalvon läpäisseiden solujen määrään.

Käytimme 24-kaivoista Transwell-kuoppalevyä (tuote #3422, Corning Inc.), HSC-3-solulinjaa sekä 10 µM nikotiinia, 100 nM estradiolia ja 10 nM DHT:tä. Estradiolia ja DHT:tä testattiin sekä erikseen että nikotiinin yhdistettynä kyseisillä pitoisuuksilla. Menetelmän toimivuutta seurattiin kontrollien (tutkittava aine korvattu 70% etanolilla) ja positiivisten kontrollien (tutkittava aine korvattu 70% etanolilla ja kasvualustana tavallinen elatusaine) avulla. Lisäksi jokaisesta kaivosta tehtiin kolme rinnakkaista kopiota ja koe toistettiin viisi kertaa. Kokeet suoritettiin FM Islam Faressin kanssa.

Jokaiseen kuppiin pipetoitiin aluksi 50 µl solujen kasvu ympäristönä toimivaa myogeeliä. Käytimme 0,2% agarosia sisältävää 2,4 mg/ml myogeeliä, joka laimennettiin seerumittomaan elatusaineeseen. Geelin annettiin hyytyä inkuboimalla kuoppalevyä ensin 30 minuuttia huoneenlämmössä ja sitten 30 minuuttia inkubaattorissa (lämpö 37 °C ja CO₂-pitoisuus 5%). Inkubaation aikana HSC-3-solut trypsinisoitiin ja laskettiin. Trypsiinin inaktivointiin käytettiin trypsiini-inhibiittoria. Inkubaation jälkeen jokaiseen kuppiin viljeltiin 50 000 HSC-3-syöpäsolua liuotettuna 200 µl:aan elatusainetta, joka sisälsi 0,5% laktalbumiinia. Viimeiseksi kuppeihin pipetoitiin seerumittomaan elatusaineeseen liuotettuja tutkittavia aineita joko erikseen tai toisiinsa yhdistettyinä. Liuosta lisättiin jokaisen tutkittavan aineen osalta siten, että koepitoisuuksiksi saatiin 10 µM nikotiinille, 100 nM estradiolille ja 10 nM DHT:lle. Ulompiin kaivoihin pipetoitiin 300 µl 10% seerumia sisältävää elatusainetta, jonka jälkeen kuoppalevyä inkuboitin (lämpö 37 °C ja CO₂-pitoisuus 5%) 72 tuntia. Tämän jälkeen pohjakalvon läpäisseet solut kiinnitettiin paikoilleen 4% formaldehydillä ja kuoppalevyä inkuboitin huoneenlämmössä 60 minuuttia. Kiinnittyneet solut huuhdeltiin kerran PBS-liuoksella (fosfaattipuskuroitu suolaliuos) ja värjättiin toluidiinisinisen liuoksella (suodatettu 1% toluidiinisininen ja 1% booraksi tislatussa vedessä). Värjäystä seurasi kuoppalevyn 5-10 minuutin inkubaatio huoneenlämmössä, jonka jälkeen ylimääräinen väri poistettiin huuhtelemalla kaivot deionisoidulla vedellä. Kuppien muihin kohtiin kuin pohjakalvoon tarttunut taustaväri poistettiin varovaisesti vanupuikoilla pyyhkimällä. Pohjakalvoista väri irrotettiin pipetoimalla jokaiseen kaivoon 500 µl 1% SDS -liuosta. Näin syntynyttä väriaineliuosta pipetoitiin kustakin kaivosta 150 µl 96-kuoppalevylle kolmeen kaivoon ja liuosten absorbanssit mitattiin spektrofotometrillä 650 nm aallonpituudella.

4.2.4 Migraatio ja invaasiokokeet: IncuCyte *Scratch wound healing* -menetelmä

Koemenetelmä perustui soluviljelmän keskelle luotavan solutyhjän alueen eli ”haavan” umpeenkasvuun (*scratch wound healing* -menetelmä). Haavan täyttymistä seurattiin IncuCyte-kvantamislaitteen avulla, jolloin nähtiin, kuinka tutkittavat aineet vaikuttivat ”haavan paranemiseen” eli joko solujen migraatioon tai invaasioon niiden kasvu ympäristöstä riippuen. IncuCyte ZOOM (Essen BioScience) on elävien solujen kuvantamiseen tarkoitettu inkubaattorin sisäinen mikroskopointijärjestelmä, joka

mahdollistaa solujen reaaliaikaisen tarkastelun useiden päivien ajan niitä häiritsemättä. Tulokset luettiin ulkoiselta tietokoneelta IncuCyte ZOOM -ohjelmiston (Essen BioScience) avulla, johon kuvantamislaitte oli kytketty. Tuloksia varten tietokone laski kuvantamislaitteen ottamien kuvien perusteella solutyhjän alueen täyttymisnopeuden.

Käytimme HSC-3- ja SCC-25-solulinjoja sekä tutkittavista aineista kolmea pitoisuutta: 2 μ M, 10 μ M, 50 μ M nikotiinia, 20 nM, 100 nM, 500 nM estradiolia ja 2 nM, 10 nM, 50 nM DHT:tä. Migraatio- ja invaasiokokeet poikkesivat toisistaan, joten ne suoritettiin omilla 96-kuoppalevyillään. Menetelmän toimivuutta seurattiin kontrolleilla (tutkittava aine korvattu 70% etanolilla). Lisäksi jokaisesta kaivosta tehtiin kolme rinnakkaista kopiota ja molemmat kokeet toistettiin kolme kertaa. Suoritin kokeet FM Katja Tuomaalan kanssa.

Molemmat kokeet alkoivat kaivojen esipäällystyksellä myogeelin ja kollageenin seoksella, jolla luotiin kasvualusta soluille. Seos valmistettiin seerumittomaan DMEM-elatusaineeseen (Life Technologies) liuotetusta 0,3 mg/ml myogeelistä sekä 0,3 mg/ml kollageenistä suhteessa 1:1. Käytimme Corning Collagen I, rat tail -kollageenia (Corning inc.), joka laimennettiin yhtiön laatimien ohjeiden sivulta 3 löytyvän vaihtoehtoisen menetelmän mukaan (48). Seosta pipetoitiin 50 μ l:aa jokaiseen kaivoon, jonka jälkeen kuoppalevyjä inkuboitiin (lämpö 37 °C ja CO₂-pitoisuus 5%) 24 tuntia. Seuraavaksi kaivoihin viljeltiin 25 000 HSC-3- tai SCC-25-syöpäsolua liuotettuna 100 μ l:aan seerumitonta DMEM-elatusainetta ja kuoppalevyjä inkuboitiin (lämpö 37 °C ja CO₂-pitoisuus 5%) 24 tuntia. Tämän jälkeen kaivoihin luotiin solutyhjät alueet eli ”viillettiin haavat” WoundMaker-laitteella (Essen BioScience) valmistajan laatiman ohjeen sivun 3 mukaisesti (49). Seuraavaksi migraatiolevyn kaivot tyhjennettiin elatusaineesta ja tilalle vaihdettiin 100 μ l:aa seerumitonta DMEM-elatusainetta, joka sisälsi halutun pitoisuuden nikotiinia, estradiolia tai DHT:tä. Invaasiolevyn kaivot päällystettiin uudelleen, mitä varten valmistettiin 2,4 mg/ml myogeelin ja 2,4 mg/ml kollageenin 1:1 seos vastaavilla menetelmillä kuin esipäällystyksessä. Seokseen lisättiin myös nikotiinia, estradiolia tai DHT:tä siten, että saavutettiin haluttu pitoisuus. Invaasiolevyn kaivot tyhjennettiin elatusaineesta ja tilalle pipetoitiin myogeelin sekä kollageenin seosta 50 μ l. Tämän jälkeen invaasiolevyä inkuboitiin (lämpö 37 °C ja CO₂-pitoisuus 5%) 30 minuuttia. Geelin hyödyttyä sen päälle pipetoitiin vielä 50 μ l:aa seerumitonta DMEM-elatusainetta. Valmiit migraatio- ja invaasiolevyt asetettiin

inkubaattorin (lämpö 37 °C ja CO₂-pitoisuus 5%) sisäiseen IncuCyte-kuvantamislaitteeseen 72 tunnin ajaksi. IncuCyte-ohjelmiston asetukseksi valittiin ”Scratch Wound” ja kuvantamisväliksi 1 tunti.

4.2.5 Immunohistologisten syöpäkudoksenäytteiden valmistelu

Potilasnäytteet (n=68) oli saatu Oulun ja Tampereen yliopistollisten keskussairaaloiden kielisyöpäpotilasnäytteistä. Tutkimuksen immunohistokemiallista osuutta varten potilaiden kielisyövästä valmistetut histologiset leikkeet värjättiin α 7-nikotiinireseptorin vasta-aineella. Käytimme Nicotinic Acetylcholine R alpha 7/CHRNA7 Antibody -vasta-ainetta (NBP1-52375, Novus Biologicals), jonka tarkemmat tiedot ovat saatavilla valmistajan laatimasta tuoteasiakirjasta (50). Optimaalisen tuloksen löytämiseksi värjäystä testattiin eri pitoisuuksilla, ja parhaaksi osoittautui 1:150. Vahvempi pitoisuus värjäsi näytteen liian tummaksi ja laimeampi liian vaaleaksi. Värjäytymisen onnistuminen varmistettiin kontrollinäytteiden avulla, minkä lisäksi värjäystä testattiin aivo- ja rintasyöpäleikkeisiin kudospöytäisten värjäytymiserojen tutkimiseksi. Leikkeiden valmistuksesta ja värjäyksestä vastasi Oulun yliopiston suusyövän tutkimusryhmän laboratoriomestari Tanja Kuusisto.

4.2.6 Immunovärjättyjen lasien mikroskopiointi

Mikroskopoin kaikki näytteet FM Islam Faressin kanssa suupatologian erikoishammaslääkäri Fabricio Passador-Santoksen antaman ohjeistuksen mukaisesti. Näytteiden eri osien värjäytyneisyys pisteytettiin silmämääräisesti niiden prosentuaalisen värjäytymisintensiteetin mukaan. Värjäytymättömyys sai arvon 0, heikko värjäytyminen sai arvon 1, kohtalainen värjäytyminen sai arvon 2 ja voimakas värjäytyminen sai arvon 3. Pisteytettäviä tekijöitä olivat kasvaimen, kasvaimen leviämisyvyhykkeen (kielen lihaksiin leviävä kasvaimen osa), kasvaimen viereisen epiteelin sekä kasvainta ympäröivän strooman värjäytyneisyys. Arviointi tehtiin tietämättä näytteisiin liittyneitä potilaiden kliinisiä tietoja sekä erillisesti ilman tietoa toisen mikroskopioijan pisteytyksestä. Mikäli tuloksia vertailtaessa arvoista esiintyi

erimielisyyttä, tehtiin konsensus yhdessä. Lopuksi arvoista tehtiin yhteenveto ja tarkastettiin näytteisiin liittyvät kliiniset tiedot. Tulosten statistisessa analysoinnissa auttoi HLT Alhadi Almangush.

4.2.7 Tilastolliset analyysit

Potilasnäytteet (n=68) jaettiin tulosten tarkastelua varten kahteen ryhmään. Pisteytyksessä arvon 1 saaneet muodostavat heikomman värjäytymän ryhmän ja arvon 2 tai 3 saaneet korkeamman värjäytymän ryhmän. Jako tehtiin, koska arvojen 2 ja 3 huomattiin vastaavan tulosten osalta toisiaan hyvin läheisesti. Tuloksissa kasvaimen läheisen epiteelin, kasvaimen, kasvaimen leviämisyöhykkeen sekä kasvainta ympäröivän strooman tulehdussolujen värjäytyneisyyttä on verrattu taudin uusimisajankohtaan (tautivapaa hoidon jälkeinen aika, disease-free survival, DSF) sekä kuolleisuuteen (disease-specific survival, DSS). Mikäli kyseisissä yhden muuttujan analyyseissa saatiin merkitsevä p-arvo ($p < 0.05$), tehtiin useamman muuttujan analyysi. Näin kävi kuitenkin ainoastaan verrattaessa kasvainta ympäröivän strooman tulehdussolujen värjäytyneisyyttä ja taudin uusimista. Merkitsevän p-arvon saaneen korkeamman värjäytyneisyyden ryhmän osalta otettiin täten huomioon myös potilaiden ikä, sukupuoli ja kasvaimen levinneisyysaste. Tulokset on esitetty Kaplan-Meier-kuvaajilla, jossa x-akselilla on aika viikkoina ja y-akselilla potilaiden kumulatiivinen selviytyminen. Merkitsemättömän p-arvon saaneiden analyysien tulokset on esitetty liitteiden 19-23 kuvissa, lukuun ottamatta kasvaimen läheisen epiteelin värjäytyneisyyttä, jolla ei ollut yhteyttä taudin uusimiseen (HR 0.75, 95% CI 0.34-1.69, $P = 0.49$) eikä kuolleisuuteen (HR 1.08, 95% CI 0.42-2.78, $P = 0.88$).

5 Tulokset

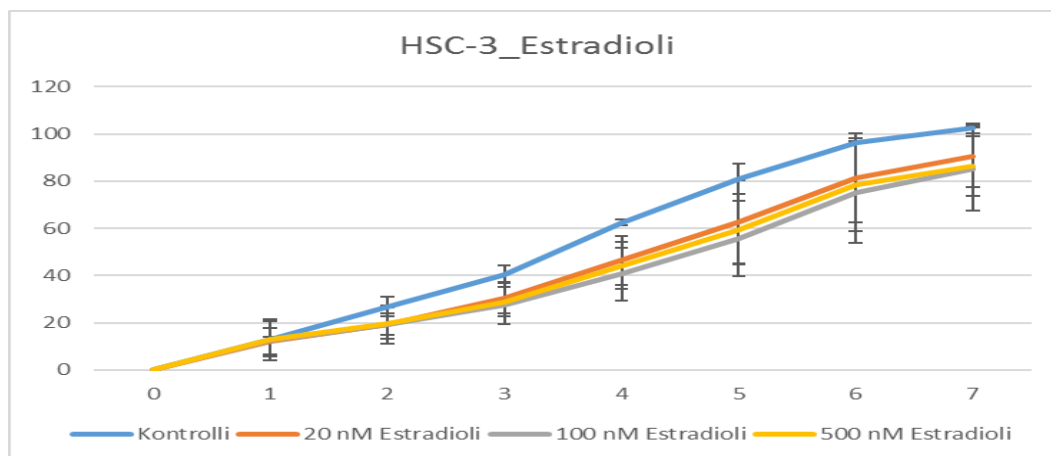
5.1 Nikotiini, estradioli ja DHT eivät vaikuttaneet HSC-3-solujen jakaantumiseen tai invaasioon

Tulokset BrdU- ja Transwell-kokeista vaihtelivat eri koekertojen välillä ja vastasivat jokaisen tutkittavan aineen kohdalla läheisesti kontrollin arvoja. Tutkittavat aineet eivät täten vaikuttaneet HSC-3-solujen jakaantumiseen tai invaasioon kyseisissä kokeissa (Liitteet 1 ja 2).

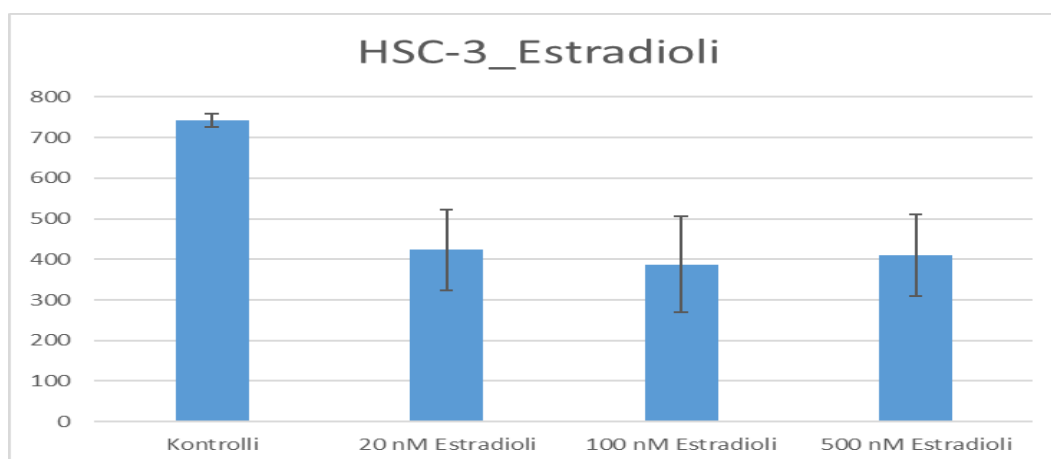
5.2 Estradioli hidasti HSC-3- ja SCC-25-solujen migraatiota ja invaasiota *scratch wound healing* -kokeissa

Estradioli hidasti HSC-3-solujen migraatiota (Kuvaaja 3) ja invaasiota (Kuvaaja 7) tasaisesti pitoisuudesta riippumatta, kun SCC-25-soluilla estradiolin pitoisuuden kasvu hidastaa migraatiota (Kuvaaja 5) ja invaasiota (Kuvaaja 9) voimakkaammin. Nikotiinin ja DHT:n osalta tulokset joko vaihtelivat eri koekertojen välillä tai vastasivat kontrollin arvoja, joten emme voi todeta niillä olevan vaikutusta kummankaan solulinjan migraatioon tai invaasioon (Liitteet 3-18).

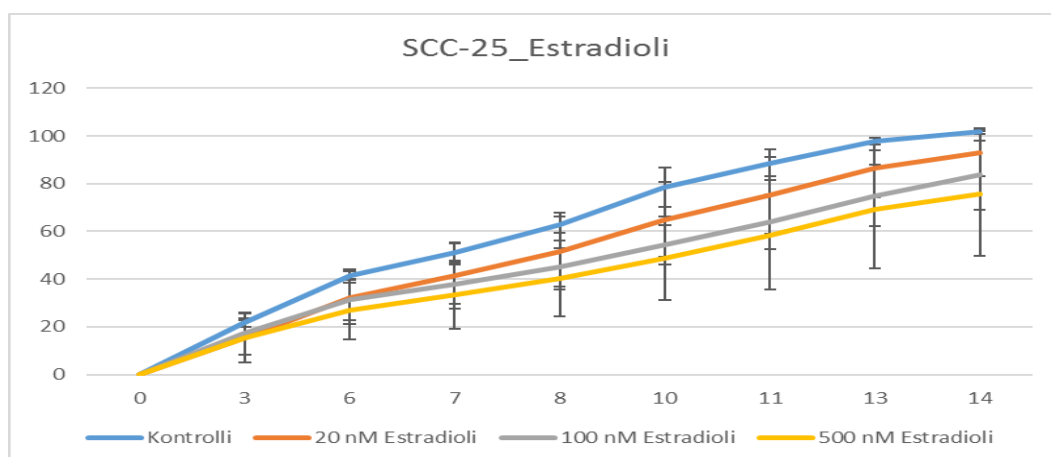
Kokeiden tulokset on esitetty estradiolin osalta kahden eri kuvaajan avulla. Viivadiagrammissa x-akselilla on aika tunteina ja y-akselilla tutkittavan solutyhjän alueen täyttyminen prosentteina. Kuvaajien piirtämiseen on käytetty eri koekertojen keskiarvoja ja -hajontoja. Täyttymisajat vaihtelivat koekertojen välillä, joten selkeyden vuoksi kuvaajat on sovitettu vastaamaan täyttymistä ajassa, jossa vähintään 95% tutkittavasta alueesta kullakin kerralla umpeutui. Pylväsdiagrammit kuvaavat pinta-alaa käyrän alla (area under curve, AUC) ja niissä esiintyvät arvot ovat eri koekertojen pinta-alojen keskiarvoja sekä -hajontoja.



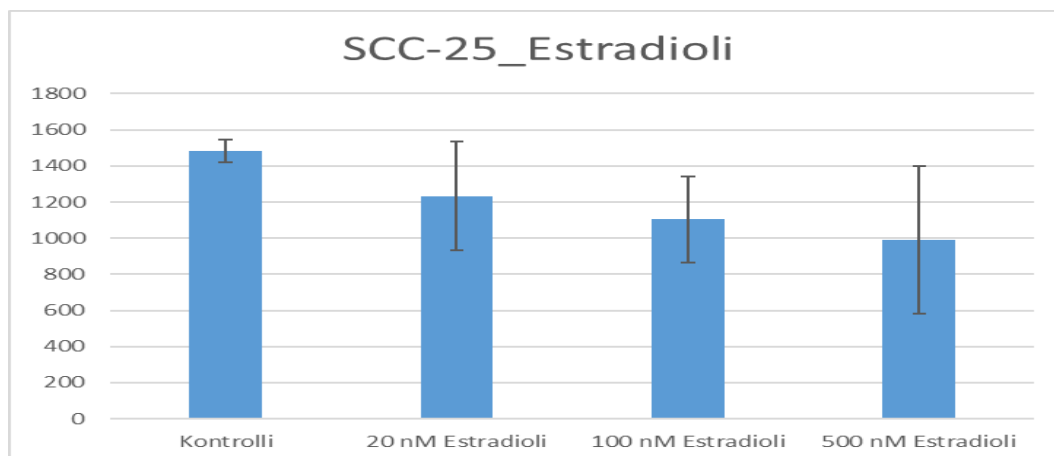
Kuvaaja 3. Estradiolin vaikutus HSC-3-solujen migraatioon.



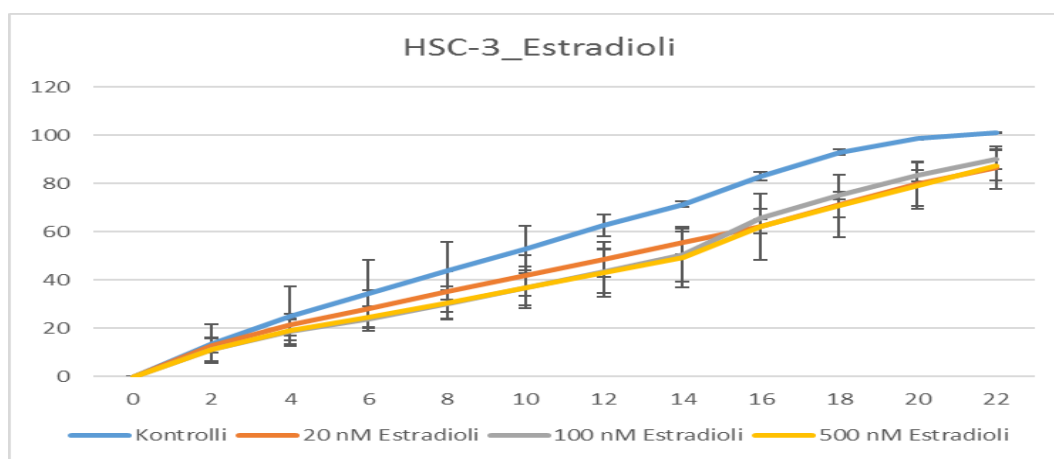
Kuvaaja 4. Estradiolin AUC-arvot HSC-3-solujen migraatiokokeissa.



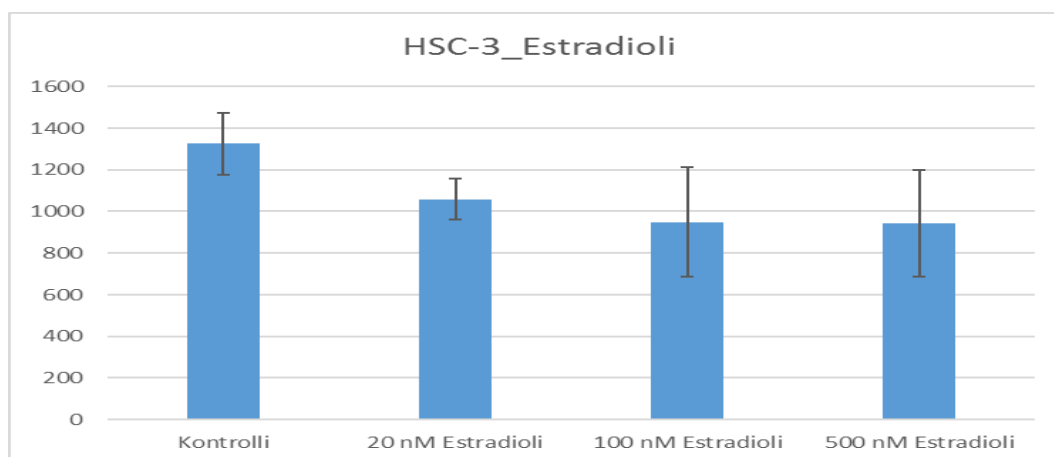
Kuvaaja 5. Estradiolin vaikutus SCC-25-solujen migraatioon.



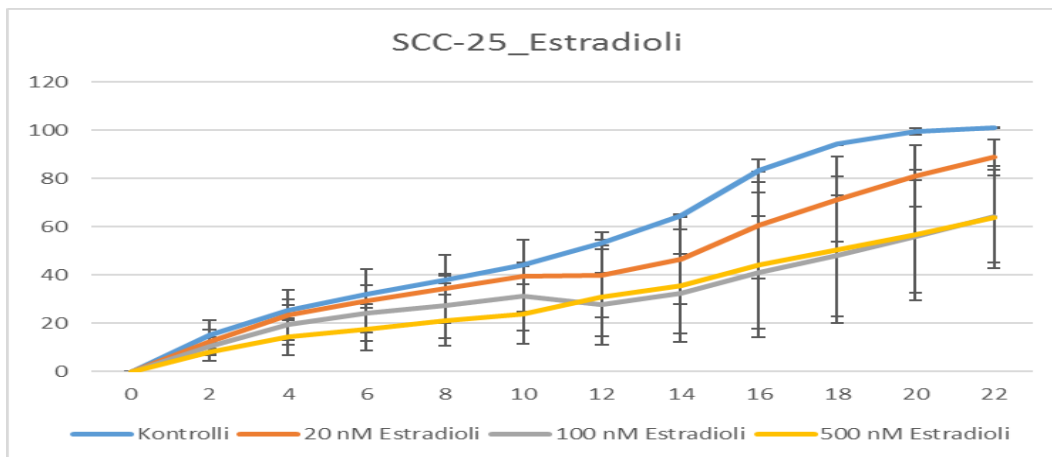
Kuvaaja 6. Estradiolin AUC-arvot SCC-25-solujen migraatiokokeissa.



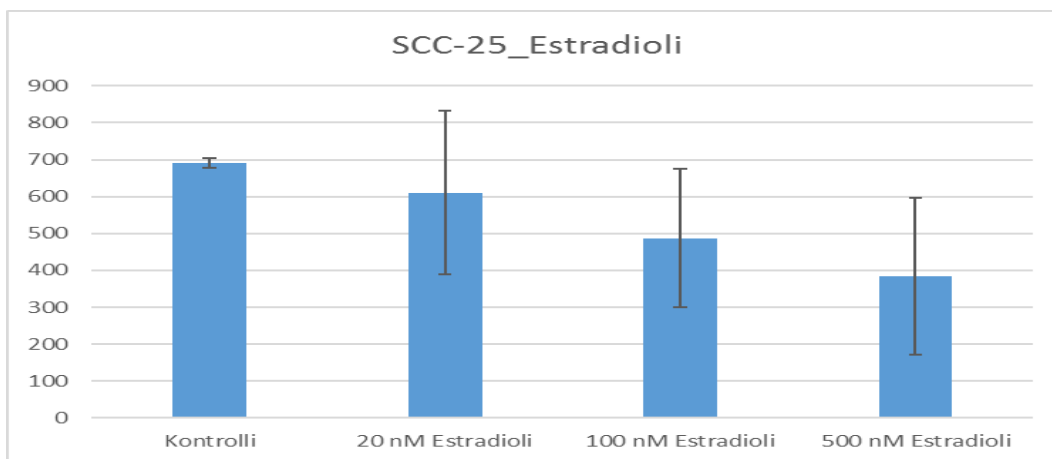
Kuvaaja 7. Estradiolin vaikutus HSC-3-solujen invaasioon.



Kuvaaja 8. Estradiolin AUC-arvot HSC-3-solujen invaasiokokeissa.



Kuvaaja 9. Estradiolin vaikutus SCC-25-solujen invaasioon.

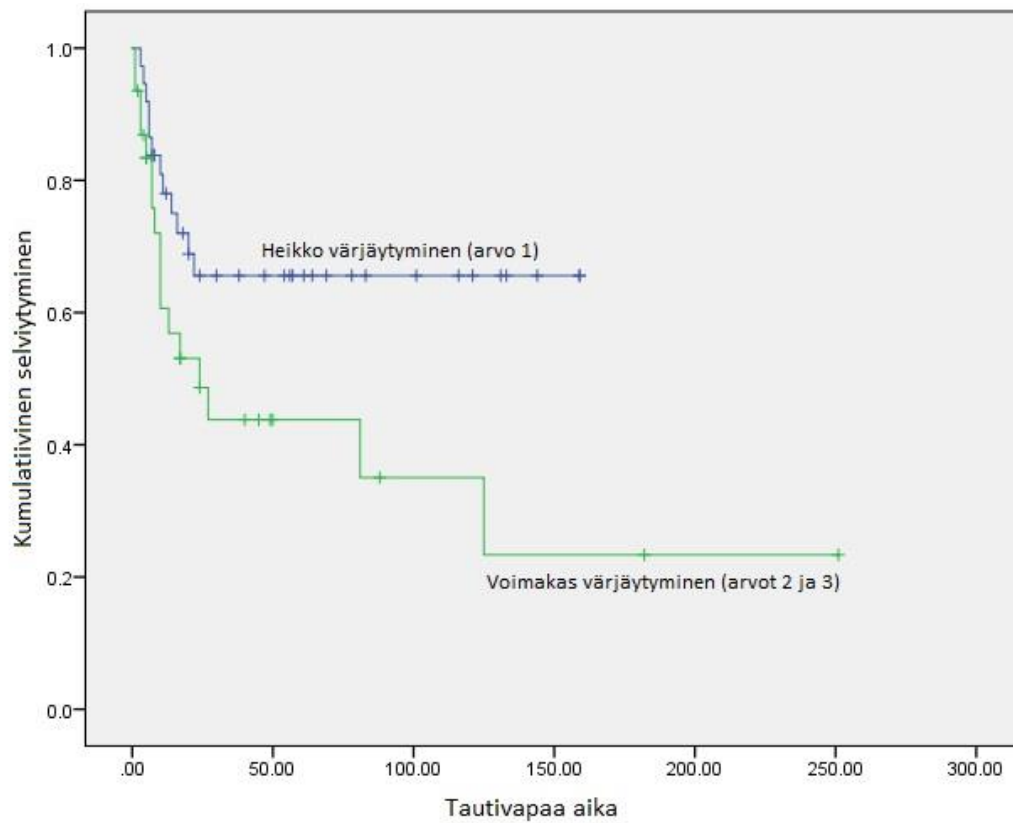


Kuvaaja 10. Estradiolin AUC-arvot SCC-25-solujen invaasiokokeissa.

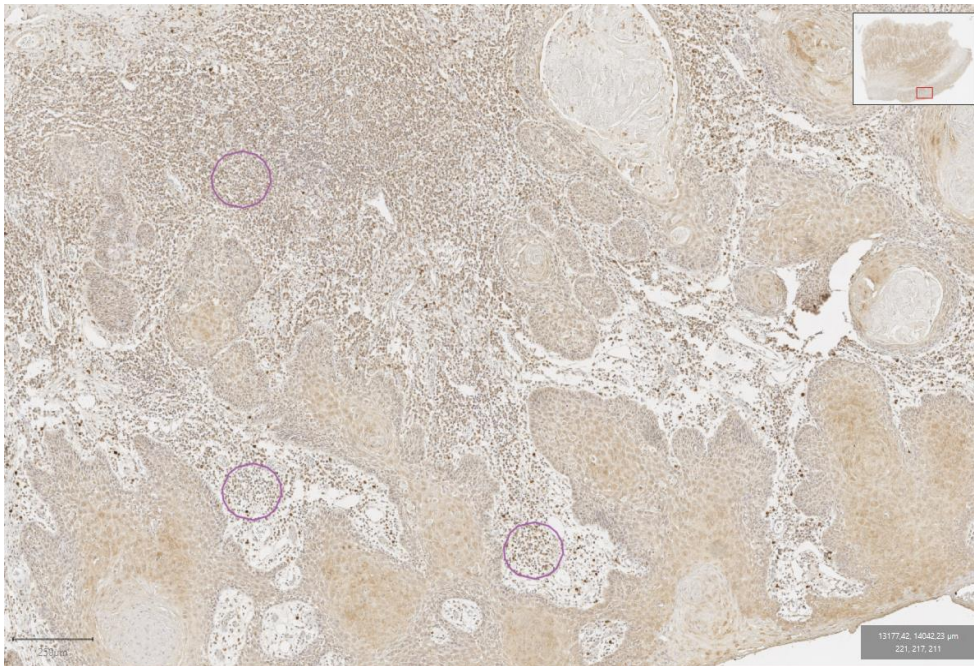
5.3 $\alpha 7$ -nikotiinireseptorin voimakas ilmeneminen kudisleikkkeen strooman tulehdussoluissa korreloi kielisyövän uusiutumiseen

Kasvainta ympäröivän strooman tulehdussolujen värjäytyneisyys korreloi kielisyövän uusiutumiseen: HR 2.17, 95% CI 1.04-4.55, $P= 0.04$ (Kuvaaja 11). Yhteys useamman muuttujan analyysissä (potilaan ikä, sukupuoli ja kasvaimen levinneisyysaste) kielisyövän uusiutumiseen: HR 2.28, 95% CI 1.07-4.88, $P= 0.033$. Strooman tulehdussolujen värjäytyneisyyden yhteys potilaiden eloonjäämiseen ei ollut tilastollisesti merkitsevä (Liite 23).

Analysoimme myös kasvaimen ja kasvaimen leviämisvyöhykkeen värjäytyneisyyden yhteyttä kielisyövän uusiutumiseen sekä potilaiden eloonjäämiseen. Tulokset eivät olleet tilastollisesti merkitseviä (Liitteet 19-22).



Kuvaaja 11. Elinaika-analyysi Kaplan-Meier -menetelmällä kuvattuna. X-akselilla aika viikkoina ja y-akselilla potilaiden prosentuaalinen osuus desimaalein ilmaistuna.



Kuva 1. Värjätty kielisyöpäleike. Kuvassa ympyröitynä kolme mielenkiinnon kohteena ollutta aluetta.

6 Pohdinta

Kielisyöpä on yleistynyt Suomessa 1980-luvulta lähtien, ja sitä esiintyy miehillä enemmän kuin naisilla. Vuosina 2010-2014 Suomessa kielisyöpään sairastui 642 ihmistä, joista 358 oli miehiä ja 284 naisia. (5) Tutkimuksemme tarkoituksena oli selvittää nikotiinin, estradiolin ja DHT:n vaikutuksia kielisyövän patogeneesiin sekä poikkeuksellisen korkean Ca^{2+} -ionien läpäisevyyden omaavan $\alpha 7$ -nikotiinireseptorin esiintyvyyden yhteyttä kielisyöpäpotilaiden ennusteeseen.

Laboratoriokokeista saamiemme tulosten perusteella estradioli hidastaa sekä HSC-3-että SCC-25-solujen migraatiota ja invaasiota. HSC-3-solujen kohdalla vaikutus on melko tasainen estradiolin pitoisuudesta riippumatta, kun taas SCC-25-solujen kohdalla estradiolin pitoisuuden kasvu voimistaa vaikutusta. Nikotiini ja DHT eivät vaikuta kyseisiin ominaisuuksiin kummallakaan solulinjalla. Solujen jakaantumista tutkittiin HSC-3-soluilla, ja mikään tutkituista aineista ei vaikuttanut jakaantumiseen. Immunohistologisten kielisyöpänäytteiden analyysin perusteella $\alpha 7$ -nikotiinireseptorin

ilmeneminen liikkuvan kielen syövässä on selvää ja sen voimakas ilmeneminen on yhteydessä kielisyövän uusiutumiseen.

Solujen jakaantumista selvittävä BrdU-leimaus toistettiin kolme kertaa HSC-3-soluilla ja tutkittavista aineista käytettiin elimistössä esiintyviä pitoisuuksia. Saamamme tulokset olivat jokaisella koekerralla yhdenmukaiset sekä hyvin tasaiset kontrolliin verrattuna, joten päätimme jättää kokeet tekemättä SCC-25-soluilla ja useammalla pitoisuudella.

Migraatiota ja invaasiota päädyttiin tutkimaan *scratch wound healing* -menetelmällä, sillä Transwell-kuoppalevyillä tehtyjen invaasiokokeiden tulokset vaihtelivat hyvin paljon viiden eri koekerran välillä. Tämä herätti oletuksemme joko meidän tekemistä tai menetelmään itseensä liittyvistä virheistä, joten päädyimme vaihtamaan sen meille soveltumattomana. Epäilemme syyksi tapaa, jolla tulokset Transwell-levyistä saatiin. Menetelmä, jolla lopullinen mitattava väriaineliuos valmistettiin, oli erittäin herkkä tekijän virheille. *Scratch wound healing* -menetelmässä solumäärän seuranta ja tulosten luku tapahtuivat tietokoneeseen kytketyllä IncyCyte-kuvantamislaitteella, eivätkä kyseiset vaiheet olleet yhtä alttiita inhimillisille virheille.

Scratch wound healing -kokeista saamamme tulos tukee hypoteesia estrogeenien syövältä suojaavasta vaikutuksesta, ja on samansuuntainen esimerkiksi ER β -reseptoreiden merkitystä suusyövässä selvittäneen tutkimuksen tulosten kanssa (37). Tulosta tukee myös kuvaajassa 2 esitetyt diagrammit kielisyövän esiintyvyydestä ikäryhmittäin. Kielisyövän esiintyvyys on huomattavasti vähäisempää alle 50 vuotiailla kuin tätä vanhemmilla naisilla. Noin 50 ikävuoden kohdalla alkavien vaihdevuosien myötä estrogeenien tuotanto vähenee, kun taas kielisyövän esiintyvyys kasvaa. Näin ollen estradioli saattaa olla yksi kielisyövän sukupuolieroja ja naisilla eri ikäryhmien välisiä eroja selittävistä tekijöistä.

Tuloksemme ei tue hypoteesia androgeenien ja nikotiinin suusyöpää edistävistä vaikutuksista, vaikka osa tutkimuksista on niin todennut (27, 28, 40). Saamiamme vaihtelevia tuloksia selittää kokeiden vähäinen toistomäärä sekä mahdollisesti kolmas koekerta, jonka tulokset poikkesivat (meille tuntemattomasta syystä) suurilta osin kahdesta aiemmasta kokeesta. Tarkempia tuloksia varten kokeet pitäisi toistaa

useamman kerran, sillä kolmella kerralla jokaisen saadun tuloksen, myös mahdollisesti virheellisen, painoarvo on suuri.

Kielisyöpäleikkeiden immunohistologisella analyysillä selvitimme liittyvätkö $\alpha 7$ -nikotiinireseptorin ilmenemisessä nähtävä erot potilaan ennusteeseen. Kyseinen reseptori valikoitui tutkimuskohteeksi, sillä sen on todettu poikkeuksellisen korkean Ca^{2+} -ionien läpäisevyyden johdosta olevan potentiaalinen suusyöpää edistävä tekijä (26, 27). Tutkimus suoritettiin vertaamalla reseptorin ilmenemisen voimakkuutta leikkeiden eri kohdissa potilaiden kliinisiin tietoihin. Tulosten perusteella kasvaimen, sen leviämisyöhykkeen sekä sitä ympäröivän strooman tulehdussolujen voimakkaalla värjäytyneisyydellä on yhteys huonontuneeseen ennusteeseen. Tulos oli tilastollisesti merkitsevä strooman tulehdussolujen ja kielisyövän uusimisen välillä, joten kasvaimen tukikudoksen $\alpha 7$ -nikotiinireseptoreilla saattaa olla erityinen merkitys kielisyövän patogeneesissä. Laboratoriokokeissa nikotiinilla ei todettu olevan merkitystä kielisyöpäsoluille, joten stroomassa olevat $\alpha 7$ -nikotiinireseptorit saattavat edistää kielisyövän kehitystä, mutta nikotiinin ohella mukana on oltava muitakin reseptorin ligandeja ja tekijöitä. Lisäksi potilailla esiintyvä kielisyöpä poikkeaa niin solujen kasvu ympäristön kuin mutaatioiden suhteen monella tapaa soluviljelyssä kasvattamistamme soluista, eivätkä tulokset täten välttämättä ole täysin yhteneviä. On hyvä myös muistaa, että tutkimme laboratoriossa vain kasvainsoluja, emme kasvaimen strooman soluja. Mahdollista jatkotutkimusta $\alpha 7$ -nikotiinireseptorin merkityksestä kielisyövälle voisi tehdä esimerkiksi soluviljelyllä tutkimalla reseptorien salpauksen vaikutuksia strooman soluihin, kuten CAF- (cancer associated fibroblasts) ja tulehdussoluihin.

Kirjallisuus

1. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009 Apr-May;45(4-5):309-16.
2. Joensuu H, Roberts PJ, Kellokumpu-Lehtinen P, Jyrkkiö S, Kouri M. Syöpätaudit. *Duodecim* 2013, 5. painos.
3. Trotta BM, Pease CS, Rasamny JJ, Raghavan P, Mukherjee S. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell cancer: key imaging findings for staging and treatment planning. *Radiographics* 2011 Mar-Apr;31(2):339-54.
4. Gorsky M, Epstein JB, Oakley C, Le ND, Hay J, Stevenson-Moore P. Carcinoma of the tongue: a case series analysis of clinical presentation, risk factors, staging, and outcome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004 Nov;98(5):546-52.
5. <http://www.cancer.fi/syoparekisteri/tilastot/ajantasaiset-perustaulukot/kokomaa/>
6. Mäkitie AA, Koivunen P, Keski-Säntti H, Törnwall J, Pukkila M, Laranne J, Luukkaa M, Vuola J, Joensuu T, Kajanti M, Grénman R. Oral tongue carcinoma and its treatment in Finland. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2007 Mar;264(3):263-7.
7. Mroueh R, Haapaniemi A, Grénman R, Laranne J, Pukkila M, Almangush A, Salo T, Mäkitie A. Improved outcomes with oral tongue squamous cell carcinoma in Finland. *Head Neck* 2017 Jul;39(7):1306-1312.
8. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF Jr. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 1988 Jun 1;48(11):3282-7.
9. Weitkunat R, Sanders E, Lee PN. Meta-analysis of the relation between European and American smokeless tobacco and oral cancer. *BMC Public Health* 2007;7:334.
10. Winn DM, Blot WJ, McLaughlin JK, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Schoenberg JB, Fraumeni JF Jr. Mouthwash use and oral conditions in the risk of oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 1991 Jun 1;51(11):3044-7.
11. Lucenteforte E, Garavello W, Bosetti C, La Vecchia C. Dietary factors and oral and pharyngeal cancer risk. *Oral Oncol* 2009 Jun;45(6):461-7.

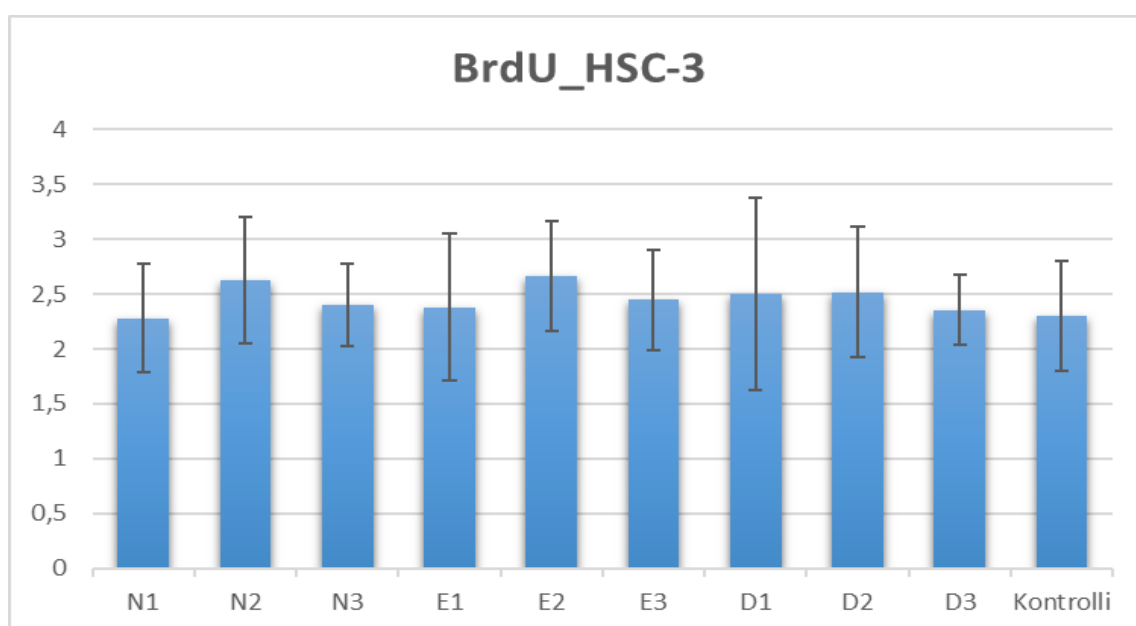
12. Sgaramella N, Coates PJ, Strindlund K, Loljung L, Colella G, Laurell G, Rossiello R, Muzio LL, Loizou C, Tartaro G, Olofsson K, Danielsson K, Fåhræus R, Nylander K. Expression of p16 in squamous cell carcinoma of the mobile tongue is independent of HPV infection despite presence of the HPV-receptor syndecan-1. *Br J Cancer* 2015 Jul 14;113(2):321-6.
13. Rosenquist K, Wennerberg J, Schildt EB, Bladström A, Göran Hansson B, Andersson G. Oral status, oral infections and some lifestyle factors as risk factors for oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. A population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol* 2005 Dec;125(12):1327-36.
14. Prime SS, Thakker NS, Pring M, Guest PG, Paterson IC. A review of inherited cancer syndromes and their relevance to oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2001 Jan;37(1):1-16.
15. Hukkanen J, Jacob P 3rd, Benowitz NL. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev* 2005 Mar;57(1):79-115.
16. Stolerman IP, Jarvis MJ. The scientific case that nicotine is addictive. *Psychopharmacology* 1995 Jan;117(1):2-10.
17. Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 2009 Jan;89(1):73-120.
18. Boron WF, Boulpaep EL. *Medical Physiology*. Elsevier Saunders 2009, 2. painos.
19. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med* 2002 Jan 31;346(5):340-52.
20. Wilson JD. Role of dihydrotestosterone in androgen action. *Prostate Suppl* 1996;6:88-92.
21. Li J, Al-Azzawi F. Mechanism of androgen receptor action. *Maturitas* 2009 Jun 20;63(2):142-8.
22. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011 Mar 4;144(5):646-74.
23. Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nature Reviews Cancer* 2003 Oct;3(10):733-44.
24. Salaspuro V, Kurkivuori J, Salaspuro M. Alkoholi, tupakka ja mikrobiit suusyövän etiologiassa. *Duodecim* 2005;121:2338–44.

25. Schuller HM. Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors? *Nat Rev Cancer* 2009 Mar;9(3):195-205.
26. Arredondo J, Chernyavsky AI, Jolkovsky DL, Pinkerton KE, Grando SA. Receptor-mediated tobacco toxicity: cooperation of the Ras/Raf-1/MEK1/ERK and JAK-2/STAT-3 pathways downstream of $\alpha 7$ nicotinic receptor in oral keratinocytes. *FASEB J* 2006 Oct;20(12):2093-101.
27. Arredondo J, Chernyavsky AI, Grando SA. Nicotinic receptors mediate tumorigenic action of tobacco-derived nitrosamines on immortalized oral epithelial cells. *Cancer Biol Ther* 2006 May;5(5):511-7.
28. Xu J, Huang H, Pan C, Zhang B, Liu X, Zhang L. Nicotine inhibits apoptosis induced by cisplatin in human oral cancer cells. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007 Aug;36(8):739-44.
29. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest* 2006 Mar;116(3):561-70.
30. Lewis-Wambi JS, Jordan VC. Estrogen regulation of apoptosis: how can one hormone stimulate and inhibit? *Breast Cancer Res* 2009; 11(3): 206.
31. Lazennec G, Bresson D, Lucas A, Chauveau C, Vignon F. ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology* 2001 Sep;142(9):4120-30.
32. Lindblad M, García Rodríguez LA, Chandanos E, Lagergren J. Hormone replacement therapy and risks of oesophageal and gastric adenocarcinomas. *Br J Cancer* 2006 Jan 16; 94(1): 136–141.
33. Lindblad M, Ye W, Rubio C, Lagergren J. Estrogen and risk of gastric cancer: a protective effect in a nationwide cohort study of patients with prostate cancer in Sweden. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004 Dec;13(12):2203-7.
34. Marocchio LS, Giudice F, Corrêa L, Pinto Junior Ddos S, de Sousa SO. Oestrogens and androgen receptors in oral squamous cell carcinoma. *Acta Odontol Scand* 2013 Nov;71(6):1513-9.
35. Egloff AM, Rothstein ME, Seethala R, Siegfried JM, Grandis JR, Stabile LP. Cross-talk between estrogen receptor and epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2009 Nov 1;15(21):6529-40.
36. Chang YL, Hsu YK, Wu TF, Huang CM, Liou LY, Chiu YW, Hsiao YH, Luo FJ, Yuan TC. Regulation of estrogen receptor α function in oral squamous cell

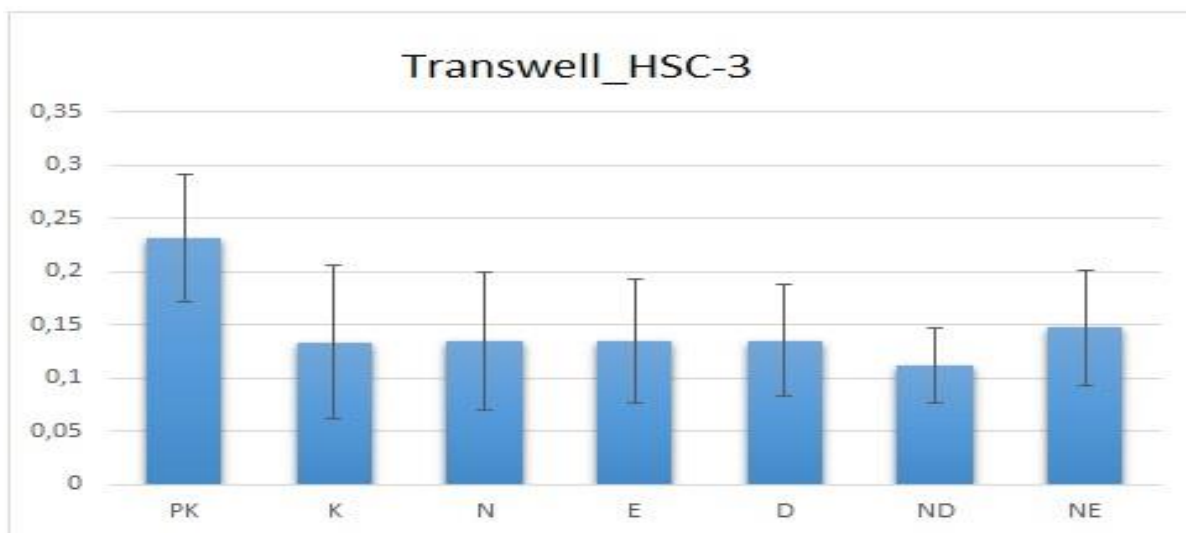
- carcinoma cells by FAK signaling. *Endocr Relat Cancer* 2014 Aug;21(4):555-65.
37. Grsic K, Opacic IL, Sitic S, Perisa MM, Sutton P, Sarcevic B. The prognostic significance of estrogen receptor β in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Lett* 2016 Nov; 12(5): 3861–3865.
 38. Culig Z, Hobisch A, Bartsch G, Klocker H. Androgen receptor--an update of mechanisms of action in prostate cancer. *Urol Res* 2000 Aug;28(4):211-9.
 39. Tian Y, Wan H, Lin Y, Xie X, Li Z, Tan G. Androgen receptor may be responsible for gender disparity in gastric cancer. *Med Hypotheses* 2013 May;80(5):672-4.
 40. Wu TF, Luo FJ, Chang YL, Huang CM, Chiu WJ, Weng CF, Hsu YK, Yuan TC. The oncogenic role of androgen receptors in promoting the growth of oral squamous cell carcinoma cells. *Oral Dis* 2015 Apr;21(3):320-7.
 41. Almangush A, Bello IO, Keski-Säntti H, Mäkinen LK, Kauppila JH, Pukkila M, Hagström J, Laranne J, Tommola S, Nieminen O, Soini Y, Kosma VM, Koivunen P, Grénman R, Leivo I, Salo T. Depth of invasion, tumor budding, and worst pattern of invasion: prognostic indicators in early-stage oral tongue cancer. *Head Neck* 2014 Jun;36(6):811-8.
 42. Sessions DG, Spector GJ, Lenox J, Haughey B, Chao C, Marks J. Analysis of treatment results for oral tongue cancer. *Laryngoscope* 2002 Apr;112(4):616-25.
 43. Rusthoven K, Ballonoff A, Raben D, Chen C. Poor prognosis in patients with stage I and II oral tongue squamous cell carcinoma. *Cancer* 2008 Jan 15;112(2):345-51.
 44. Suusyövän Käypä hoito -suositus. <http://www.kaypahoito.fi> Suusyöpä.
 45. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, Gershenwald JE, Compton CC, Hess KR, Sullivan DC, Jessup JM, Brierley JD, Gaspar LE, Schilsky RL, Balch CM, Winchester DP, Asare EA, Madera M, Gress DM, Meyer LR (eds) (2017) *AJCC cancer staging manual*, 8th edn. Springer, New York
 46. Genden EM, Ferlito A, Silver CE, Takes RP, Suárez C, Owen RP, Haigentz M Jr., Stoeckli SJ, Shaha AR, Rapidis AD, Rodrigo JP, Rinaldo A. Contemporary management of cancer of the oral cavity. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2010 Jul; 267(7): 1001–1017.

47. <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/Bulletin/1/11647229001bul.pdf>
48. csmedia2.corning.com/LifeSciences/media/pdf/SPC-354236.pdf
49. [http://www.essenbioscience.com/media/uploads/files/8400-0012-C00 - Scratch Wound Cell Migration Invasion User Manual.pdf](http://www.essenbioscience.com/media/uploads/files/8400-0012-C00_Scratch_Wound_Cell_Migration_Invasion_User_Manual.pdf)
50. <https://www.novusbio.com/PDFs/NBP1-52375.pdf>

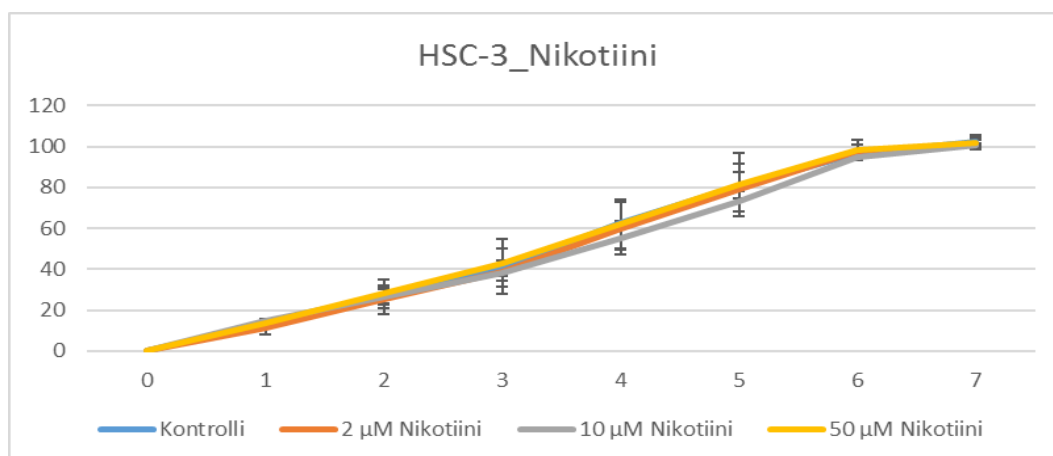
Liitteet



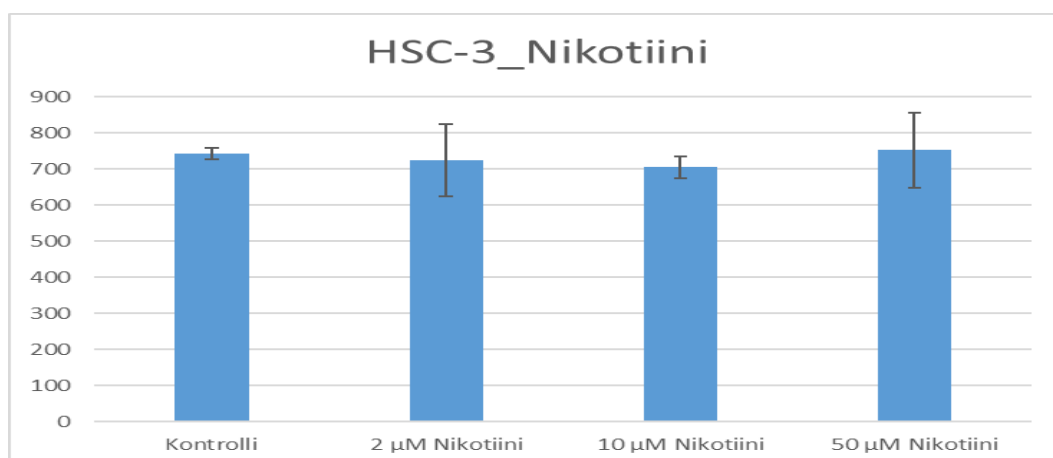
Liite 1. HSC-3-solujen jakautumista kuvaavat BrdU-kokeiden keskiarvot ja -hajonnat. Lyhenteet: N1 = 2 μ M nikotiini, N2 = 10 μ M nikotiini, N3 = 50 μ M nikotiini, E1 = 20 nM estradioli, E2 = 100 nM estradioli, E3 = 500 nM estradioli, D1 = 2 nM DHT, D2 = 10 nM DHT ja D3 = 50 nM DHT.



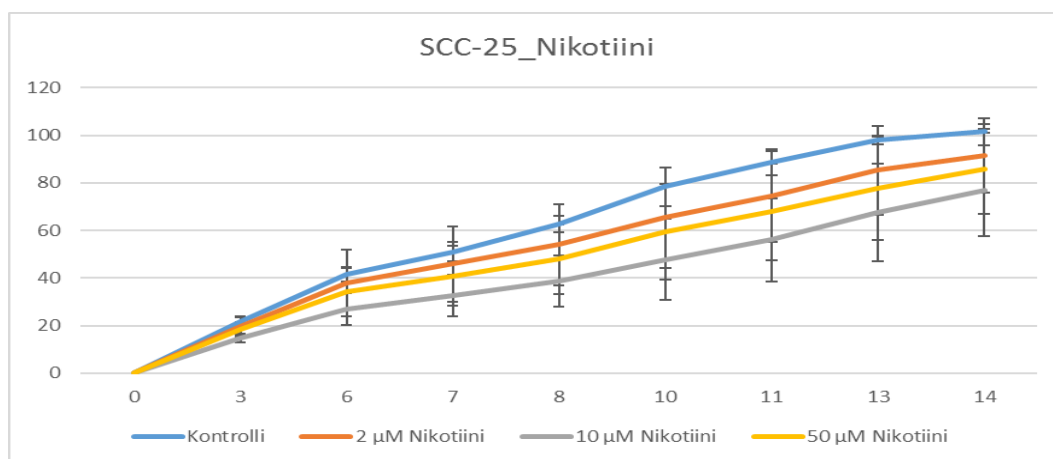
Liite 2. HSC-3-solujen invaasiota kuvaavat Transwell-kokeiden keskiarvot ja -hajonnat. Lyhenteet: PK = positiivinen kontrolli, K = kontrolli, N = 10 μ M nikotiini, E = 100 nM estradioli, D = 10 nM DHT, ND = 10 μ M nikotiini + 10 nM DHT ja NE = 10 μ M nikotiini + 100 nM estradioli.



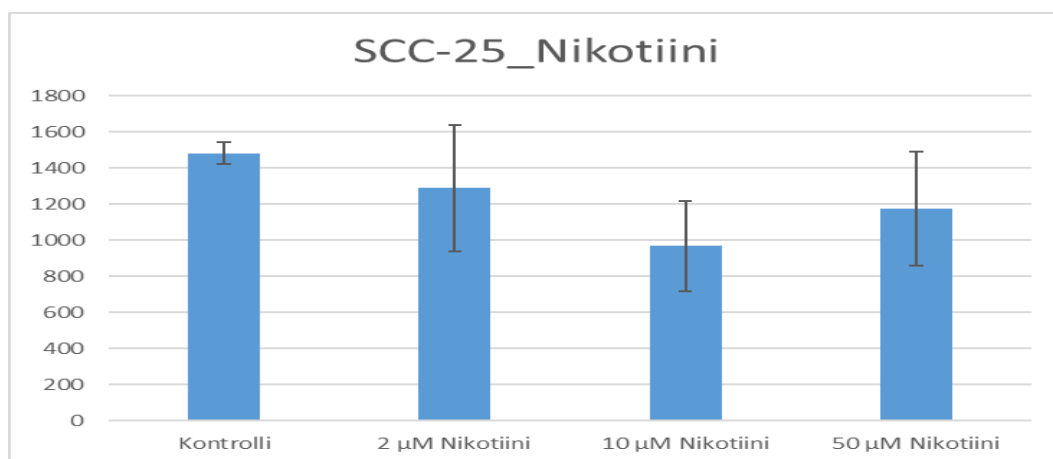
Liite 3. Nikotiinin vaikutus HSC-3-solujen migraatioon.



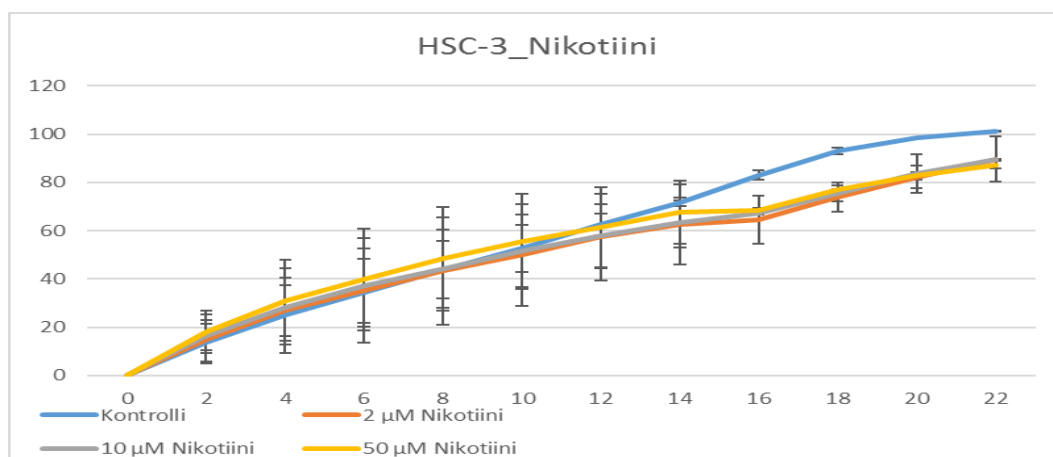
Liite 4. Nikotiinin AUC-arvot HSC-3-solujen migraatiokokeissa.



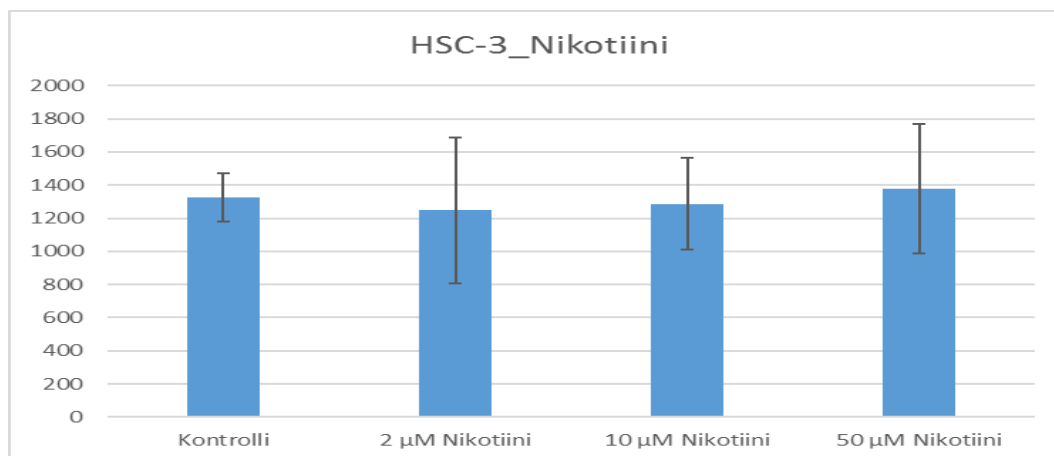
Liite 5. Nikotiinin vaikutus SCC-25-solujen migraatioon.



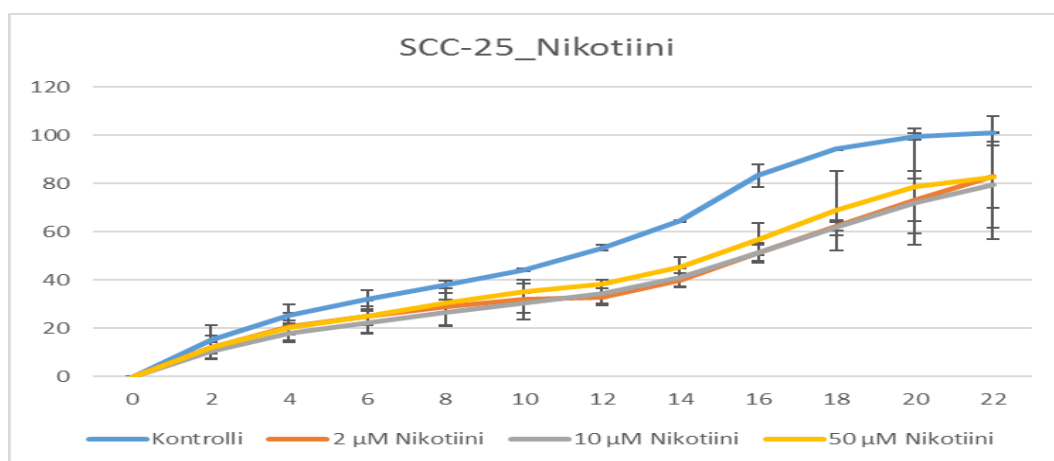
Liite 6. Nikotiinin AUC-arvot SCC-25-solujen migraatiokokeissa.



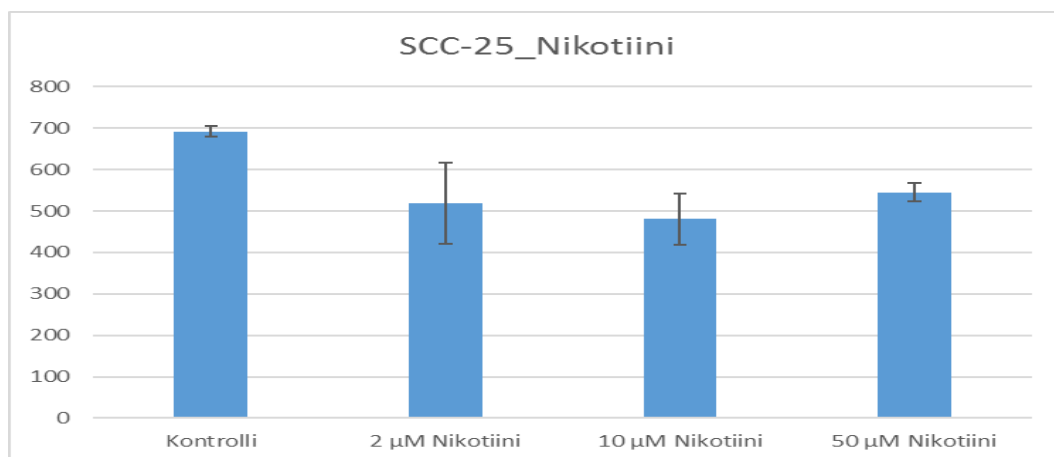
Liite 7. Nikotiinin vaikutus HSC-3-solujen invaasioon.



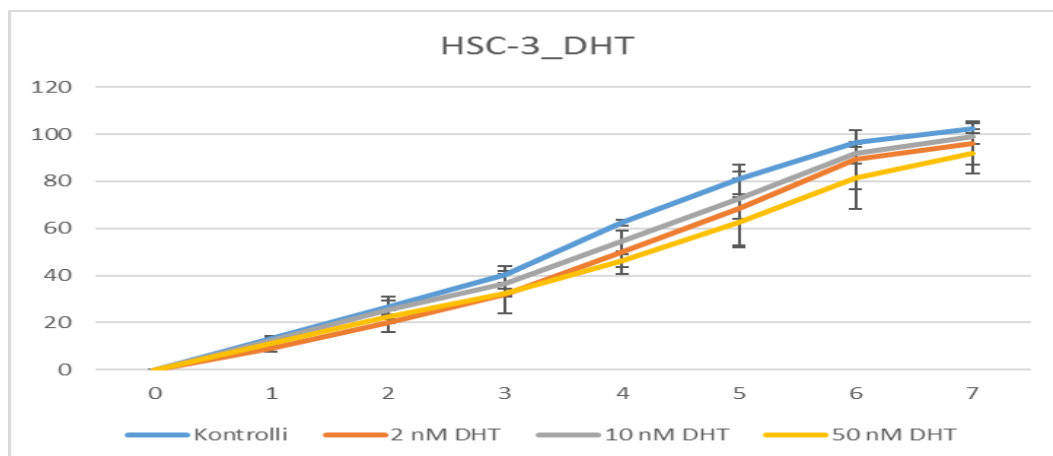
Liite 8. Nikotiinin AUC-arvot HSC-3-solujen invaasiokokeissa.



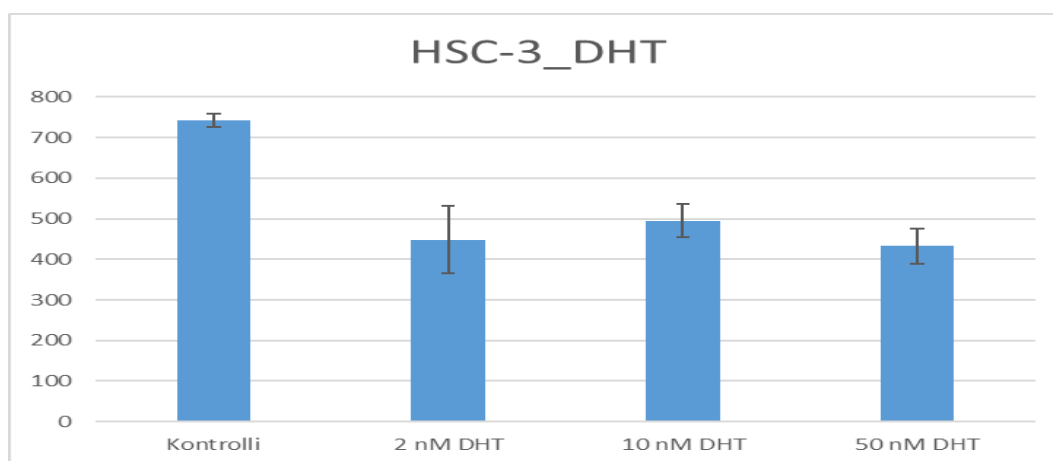
Liite 9. Nikotiinin vaikutus SCC-25-solujen invaasioon.



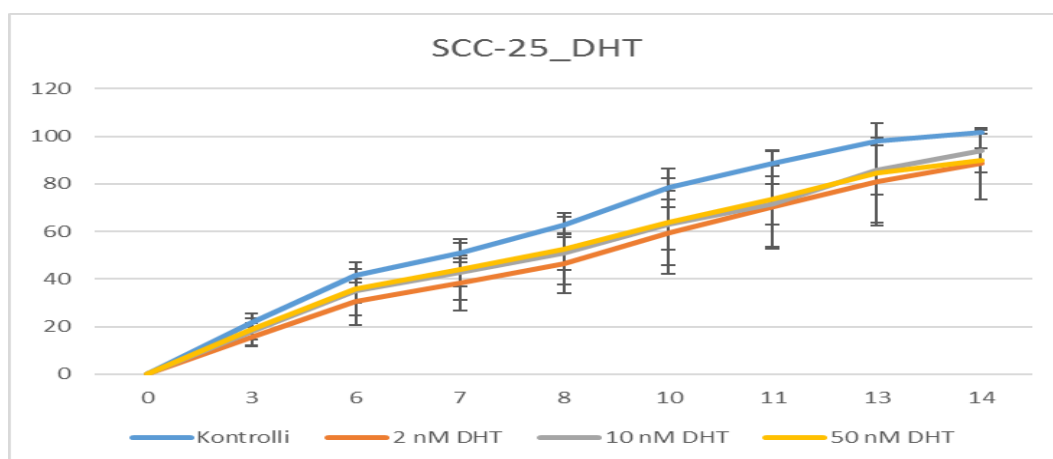
Liite 10. Nikotiinin AUC-arvot SCC-25-solujen invaasiokokeissa.



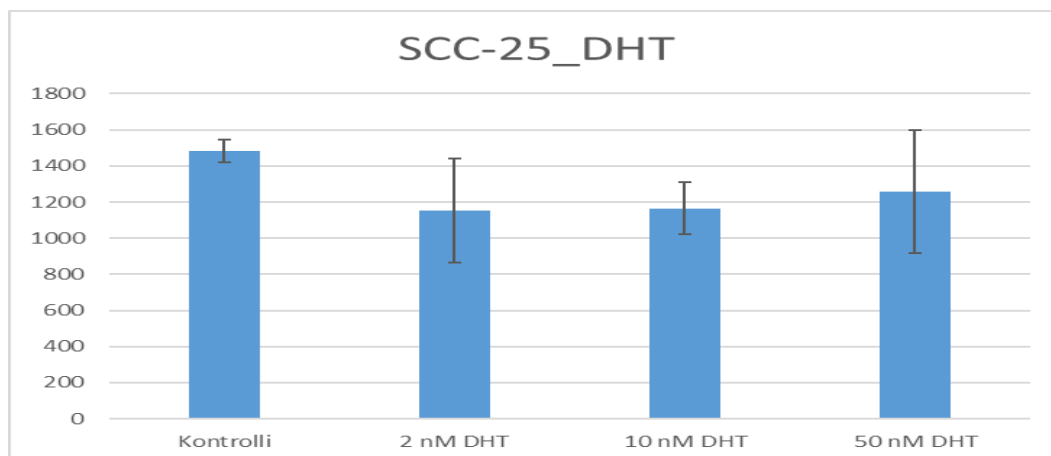
Liite 11. DHT:n vaikutus HSC-3-solujen migraatioon.



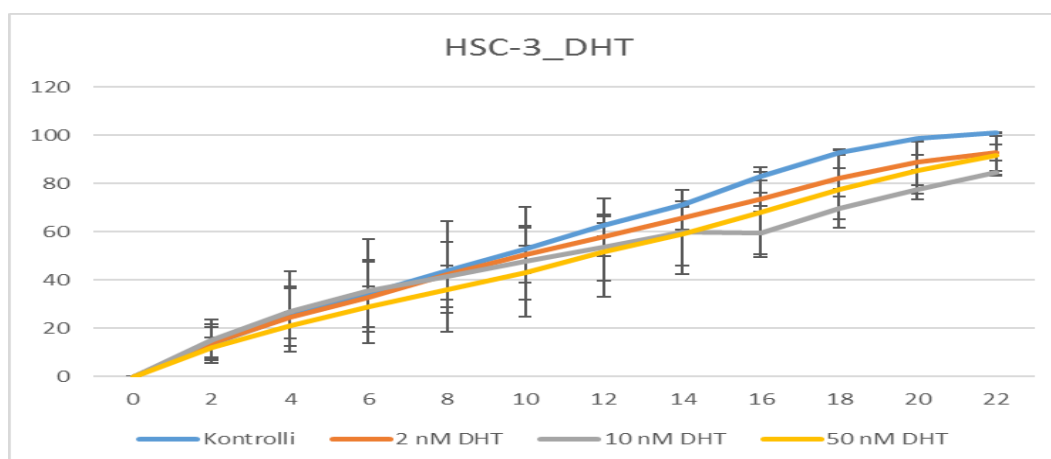
Liite 12. DHT:n AUC-arvot HSC-3-solujen migraatiokokeissa.



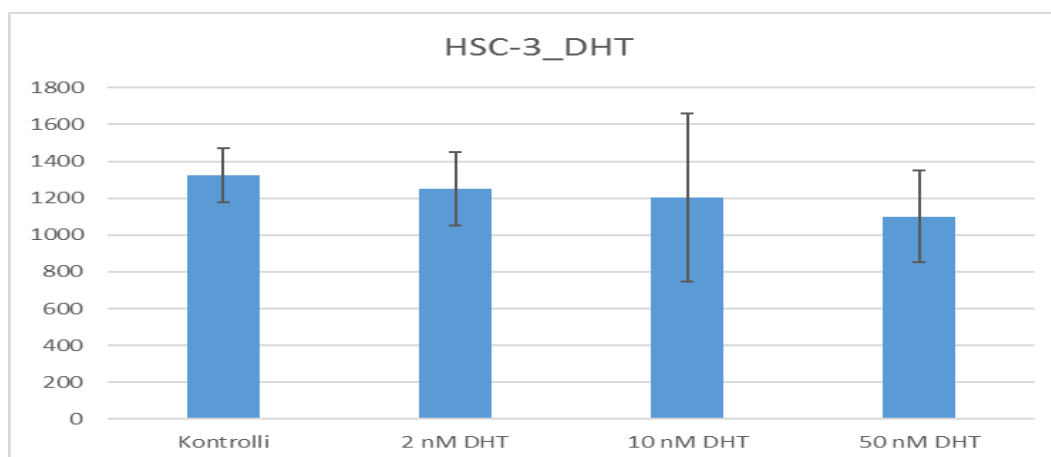
Liite 13. DHT:n vaikutus SCC-25-solujen migraatioon.



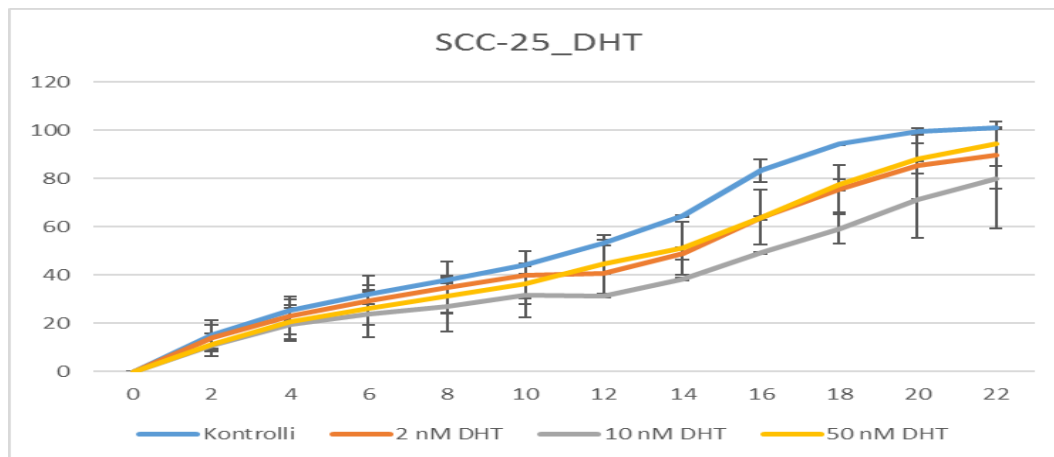
Liite 14. DHT:n AUC-arvot SCC-25-solujen migraatiokokeissa.



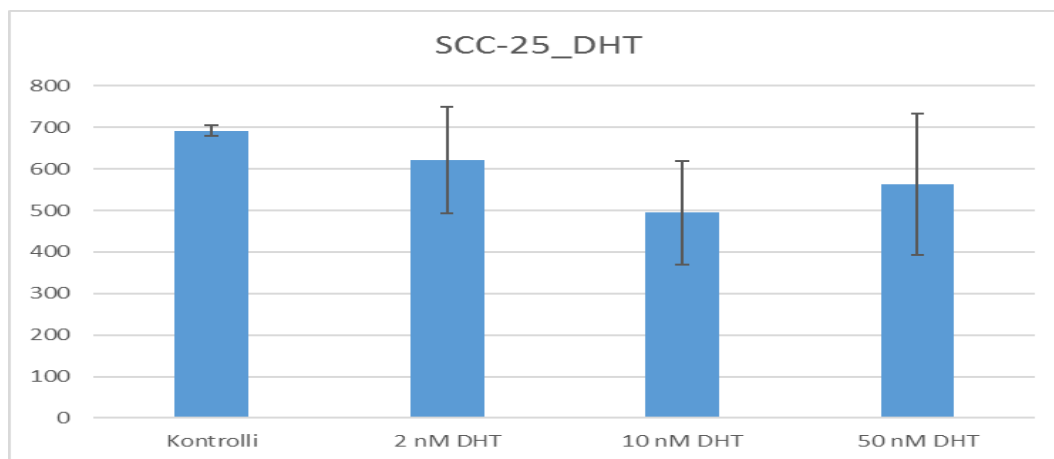
Liite 15. DHT:n vaikutus HSC-3-solujen invaasioon.



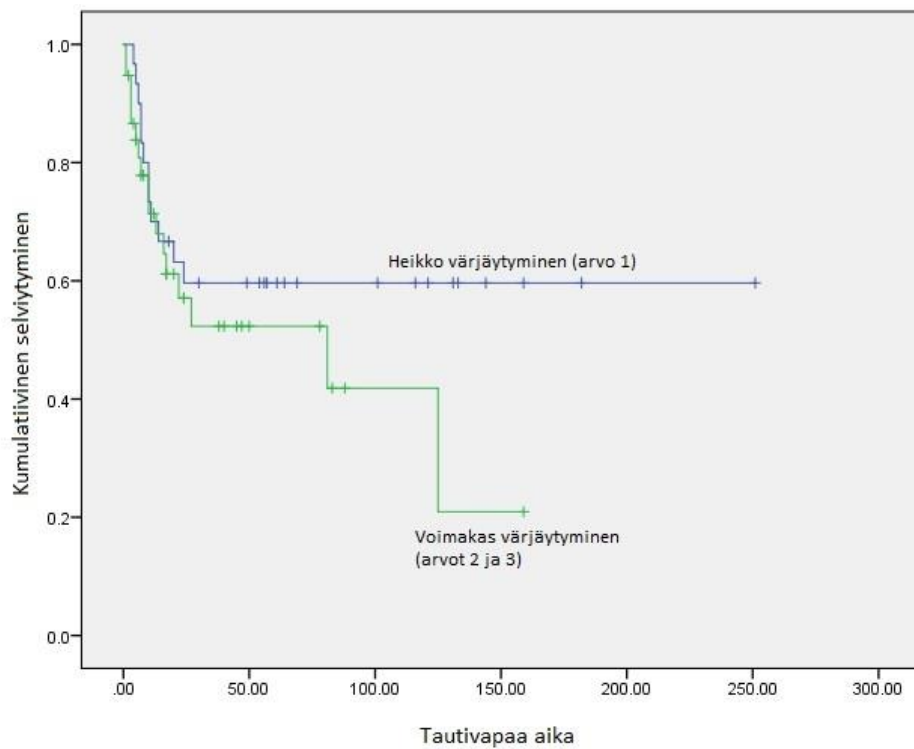
Liite 16. DHT:n AUC-arvot HSC-3-solujen invaasiokokeissa.



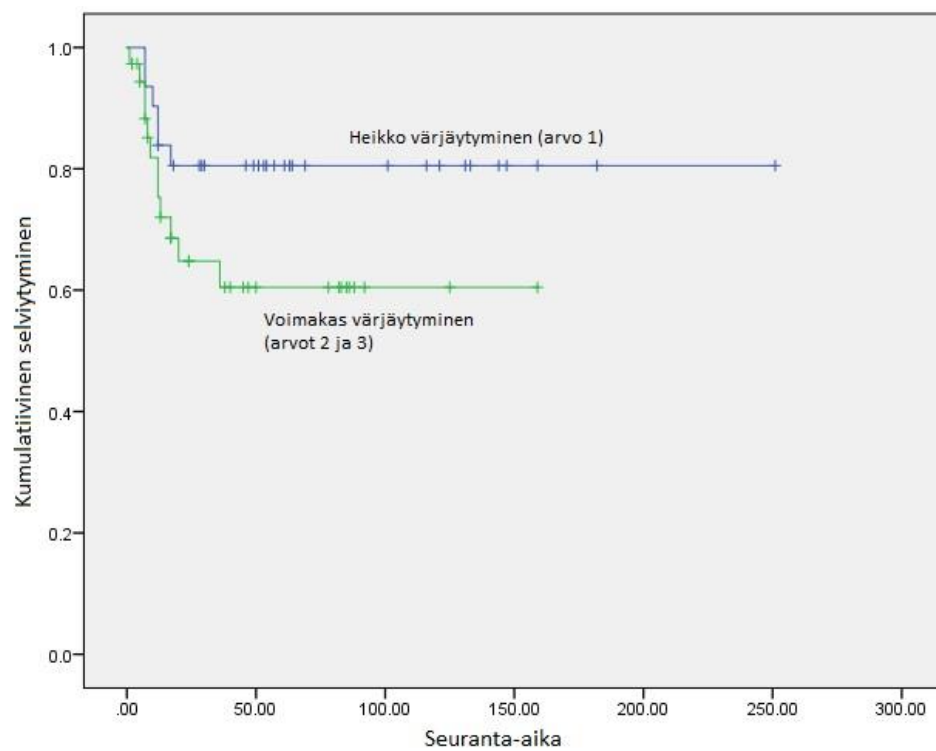
Liite 17. DHT:n vaikutus SCC-25-solujen invaasioon.



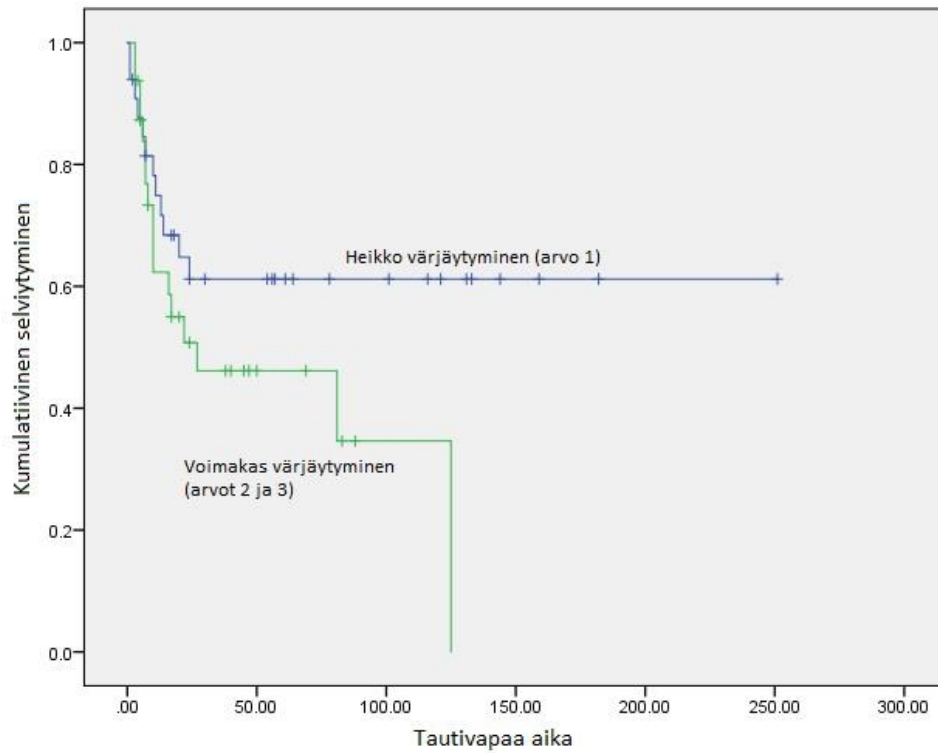
Liite 18. DHT:n AUC-arvot SCC-25-solujen invaasiokokeissa.



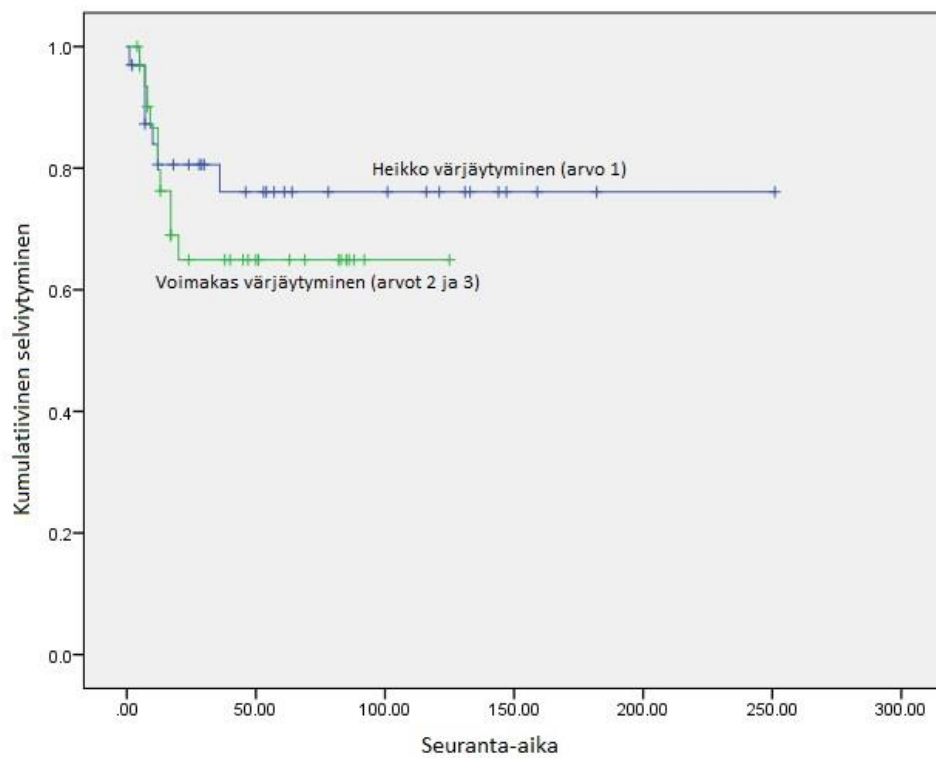
Liite 19. Kasvaimen voimakkaan värjäytyneisyyden yhteys kielisyövän uusimiseen: HR 1.5, 95% CI 0.71-3.16, $P=0.28$.



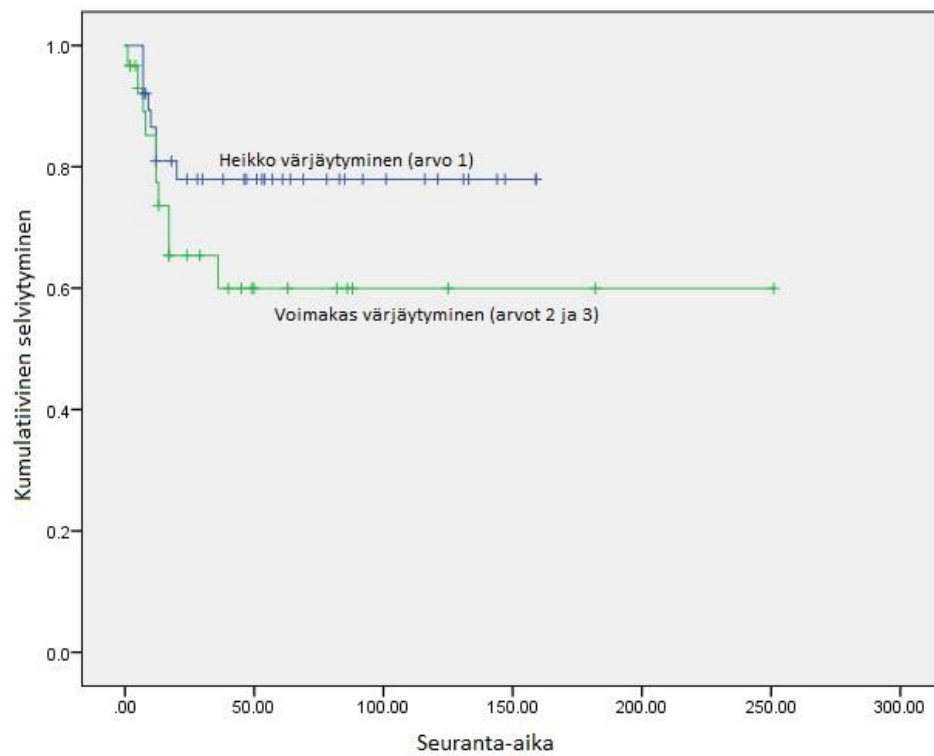
Liite 20. Kasvaimen voimakkaan värjäytyneisyyden yhteys potilaiden kuolleisuuteen: HR 2.18, 95% CI 0.82-5.80, $P=0.12$.



Liite 21. Kasvaimen leviämisvyöhykkeen voimakkaan värjäytyneisyyden yhteys kielisyövän uusimiseen: HR 1.79, 95% CI 0.85-3.78, $P=0.13$.



Liite 22. Kasvaimen leviämisvyöhykkeen voimakkaan värjäytyneisyyden yhteys potilaiden kuolleisuuteen: HR 1.49, 95% CI 0.57-3.92, $P=0.42$.



Liite 23. Kasvainta ympäröivän strooman tulehdussolujen voimakkaan värjäytyneisyyden yhteys potilaiden kuolleisuuteen: HR 1.9, 95% CI 0.75-4.82, $P=0.18$.